

目 录

第一篇 葡萄与葡萄酒酿造的微生物	1
第1章 酵母	3
1.1 引言	3
1.2 繁殖	3
1.2.1 有性繁殖	3
1.2.2 无性繁殖	4
1.3 分类	6
1.3.1 假丝酵母属 (<i>Candida</i>)	7
1.3.2 德克酵母属 (<i>Dekkera</i>)	7
1.3.3 汉逊酵母属 (<i>Hanseniaspora</i>)	9
1.3.4 伊萨酵母属 (<i>Issatchenkia</i>)	9
1.3.5 梅奇酵母属 (<i>Metschnikowia</i>)	9
1.3.6 毕赤酵母属 (<i>Pichia</i>)	9
1.3.7 酿酒酵母属 (<i>Saccharomyces</i>)	10
1.3.8 类酵母属 (<i>Saccharomycodes</i>)	11
1.3.9 裂殖酵母属 (<i>Schizosaccharomyces</i>)	11
1.3.10 接合酵母属 (<i>Zygosaccharomyces</i>)	12
1.4 所需营养物质	12
1.4.1 氮	13
1.4.2 生长限制因子	13
1.5 新陈代谢	14
1.5.1 葡萄糖	14
1.5.2 硫	19
1.5.3 风味化合物	19
1.5.4 糖苷酶	21
1.5.5 甘露糖蛋白质	22
第2章 乳酸菌	24
2.1 引言	24
2.2 分类	24
2.2.1 乳杆菌属 (<i>Lactobacillus</i>)	24
2.2.2 酒球菌属 (<i>Oenococcus</i>)	26

2.2.3	片球菌属 (<i>Pediococcus</i>)	27
2.3	营养需求	29
2.4	新陈代谢	29
2.4.1	葡萄糖	29
2.4.2	精氨酸	32
2.4.3	苹果酸	32
2.4.4	甘露醇和赤藻糖醇	33
2.4.5	双乙酰和其他风味化合物	34
第3章	醋酸菌	38
3.1	引言	38
3.2	分类	38
3.3	营养需求	39
3.4	代谢过程	39
3.4.1	碳水化合物	39
3.4.2	乙醇	41
第4章	霉菌和其他微生物	43
4.1	引言	43
4.2	生态环境	44
4.3	分类	44
4.3.1	曲霉属 (<i>Aspergillus</i> , 黑色霉菌)	44
4.3.2	葡萄孢属 (<i>Botrytis</i> , 灰霉)	44
4.3.3	青霉属 (<i>Penicillium</i> , 蓝绿色霉菌)	45
4.4	营养需求	46
4.5	代谢	46
4.5.1	葡萄糖	46
4.5.2	真菌毒素	46
4.5.3	风味成分	47
4.6	其他微生物	48
4.6.1	芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)	48
4.6.2	梭菌属 (<i>Clostridium</i>)	48
4.6.3	链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>)	49
第二篇	葡萄酒酿造与生产过程	51
第5章	微生物生长及其控制	53
5.1	引言	53
5.2	防腐剂 and 杀菌剂	53

5.2.1	二氧化硫 (SO ₂)	53
5.2.2	碳酸二甲酯	56
5.2.3	溶菌酶	58
5.2.4	山梨酸	58
5.2.5	其他防腐剂和杀菌剂	59
5.3	过滤	61
5.3.1	直流过滤 (深层或相对过滤)	62
5.3.2	直流过滤 (“绝对过滤”或“除菌过滤”)	62
5.3.3	错流/切向过滤	63
第6章	葡萄酒酿造的微生物生态学	65
6.1	引言	65
6.2	非酿酒酵母与酿酒酵母	66
6.2.1	葡萄与葡萄醪	66
6.2.2	酒精发酵	67
6.2.3	发酵后期	68
6.3	德克酵母/酒香酵母	68
6.3.1	葡萄和葡萄醪	68
6.3.2	酒精发酵及发酵后期	69
6.4	乳酸菌	70
6.4.1	葡萄和葡萄汁	70
6.4.2	酒精及苹果酸-乳酸发酵	70
6.4.3	发酵后期	71
6.5	醋酸菌	72
6.5.1	葡萄和葡萄醪	72
6.5.2	酒精发酵与发酵后期	72
6.6	微生物之间的相互作用	73
6.6.1	酿酒酵母和酒酒球菌	73
6.6.2	酿酒酵母和乳杆菌	76
6.6.3	酒酒球菌、片球菌和乳杆菌	77
6.6.4	其他的相互作用	79
第7章	葡萄采收与发酵前处理	80
7.1	引言	80
7.2	采收与运输	80
7.3	葡萄质量评估	80
7.3.1	可溶性固形物	81

7.3.2	pH 和可滴定酸	81
7.3.3	微生物腐败	82
7.4	葡萄汁的处理	83
7.4.1	酶	83
7.4.2	固体悬浮物	83
7.4.3	发酵前浸渍（冷浸渍）	84
7.4.4	热浸渍酿造法	85
7.4.5	惰性气体处理	85
7.5	微生物腐败的水果处理	86
7.5.1	酶促褐变	86
7.5.2	发酵过程中的问题	87
7.5.3	澄清问题	87
7.5.4	管理方法	87
7.6	葡萄汁的贮存	88
第8章	发酵与发酵后处理	90
8.1	引言	90
8.2	葡萄醪的供应	90
8.3	酒精发酵	92
8.3.1	种子液的发展史	92
8.3.2	种子的制备	92
8.3.3	菌株的选择	94
8.3.4	温度	94
8.3.5	固定化酵母	95
8.4	“自然”发酵	95
8.5	发酵问题	96
8.5.1	发酵迟缓/停滞	96
8.5.2	硫化氢	99
8.6	苹果酸-乳酸发酵	100
8.6.1	起始种子液的准备	101
8.6.2	菌株的选择	102
8.6.3	接种的时机	102
8.6.4	裂殖酵母的应用	105
8.7	发酵后处理	105
8.7.1	陈酿和贮存	105
8.7.2	挥发性酸的调节	106

8.8 装瓶	107
第9章 葡萄酒厂清洗消毒	109
9.1 引言	109
9.2 安全问题	109
9.3 水质	110
9.4 初步清洗	110
9.5 去污剂、清洗剂和表面活性剂	111
9.5.1 碱	111
9.5.2 酸	111
9.5.3 表面活性剂	112
9.6 漂洗	112
9.7 抑菌剂	112
9.7.1 碘	113
9.7.2 季铵化合物	113
9.7.3 二氧化硫 (SO ₂)	114
9.7.4 过氧化物	114
9.7.5 氯及氯化物	115
9.7.6 热水和蒸汽	115
9.7.7 臭氧	116
9.8 卫生控制	116
9.9 进度表及相关规定	117
第10章 质量关键点体系	119
10.1 引言	119
10.2 QP 方法的发展	119
10.3 工艺设计和操作流程图	120
10.4 质量因素分析	121
10.4.1 质量因素案例	121
10.4.2 预防措施	121
10.4.3 关键质量点	122
10.5 临界点	123
10.6 监控过程	123
10.7 纠正措施	124
10.8 记录的保留及文件存档	124
10.9 验证	124
第11章 葡萄酒腐败	126
11.1 引言	126

11.2	腐败微生物	126
11.2.1	醋杆菌 (<i>Acetobacter</i>)	126
11.2.2	德克酵母/酒香酵母 (<i>Dekkera/Brettanomyces</i>)	127
11.2.3	膜酵母 (Film Yeasts)	129
11.2.4	类酵母 (<i>Saccharomycodes</i>)	130
11.2.5	接合酵母 (<i>Zygosaccharomyces</i>)	130
11.3	葡萄酒缺陷	131
11.3.1	挥发酸	131
11.3.2	氨基甲酸乙酯 (EC)	132
11.3.3	鼠臭味	133
11.3.4	苹果酸-乳酸发酵后细菌的生长	134
11.3.5	天竺葵的气/味	135
11.3.6	生物胺	135
11.3.7	丙烯醛	137
11.3.8	甘露醇	138
11.3.9	黏性丝状物	138
11.3.10	酒石酸的利用	139
第三篇 实验室操作规范与流程		141
第12章 显微观察基本方法		143
12.1	引言	143
12.2	显微镜	143
12.2.1	放大率	143
12.2.2	分辨率	144
12.2.3	对比度	144
12.2.4	荧光显微镜	144
12.3	显微镜使用方法	145
12.3.1	显微镜结构	145
12.3.2	使用方法	146
12.3.3	目镜测微尺校准	147
12.4	制备涂片	147
12.4.1	液体培养物	147
12.4.2	固体培养物	148
12.5	制备湿片	148
12.6	制备霉菌的玻片培养物	148

第 13 章 培养基配制和培养技术	150
13.1 引言	150
13.2 培养的理化需求	150
13.2.1 碳源和氮源	151
13.2.2 氧	151
13.2.3 氢离子浓度 (pH)	151
13.2.4 水分和水活度	152
13.2.5 培养温度和条件	152
13.2.6 选择性抑制剂	153
13.3 培养基和实验用品的灭菌	153
13.3.1 沸水灭菌	153
13.3.2 高压蒸汽灭菌	153
13.3.3 干热灭菌	154
13.3.4 过滤除菌	155
13.3.5 化学灭菌	155
13.4 培养基的贮存	156
13.5 酵母和霉菌培养基	157
13.5.1 麦芽汁培养基	158
13.5.2 葡萄汁培养基	158
13.5.3 WL 培养基	158
13.5.4 酒香酵母培养基 A	159
13.5.5 酒香酵母培养基 B	159
13.5.6 酒香酵母培养基 C	159
13.5.7 酒香酵母培养基 D	160
13.5.8 赖氨酸培养基	160
13.5.9 接合酵母培养基	161
13.6 乳酸菌培养基	162
13.6.1 Rogosa 苹果汁培养基	162
13.6.2 番茄汁 - 葡萄糖 - 果糖 - 苹果酸盐培养基	163
13.6.3 精氨酸异型发酵肉汤培养基	163
13.7 醋酸菌培养基	164
13.7.1 葡萄糖 - 酵母抽提物 - 碳酸盐培养基	164
13.7.2 甘露醇 - 酵母抽提物 - 蛋白胨培养基	164
13.7.3 酵母抽提物 - 蛋白胨 - 乙醇培养基	164
13.8 无菌接种技术	165

13.8.1	固体培养基之间的接种	165
13.8.2	从固体培养基到液体培养基的接种	166
13.8.3	从液体培养基到固体培养基的接种	166
13.9	微生物的分离	167
13.10	微生物菌种的保存	168
13.10.1	斜面固体培养基或穿刺培养基制备	168
13.10.2	甘油悬浮管制备	169
13.10.3	酵母菌冷冻干燥	169
13.10.4	乳酸菌冷冻干燥	169
第14章	菌落密度测定	171
14.1	引言	171
14.2	取样	171
14.3	样品的稀释	172
14.4	直接细胞计数	174
14.4.1	运用血球计数板计数	174
14.4.2	亚甲基蓝	176
14.4.3	胭脂红-S	176
14.4.4	Wolford 法染色	176
14.5	直接平板计数	177
14.5.1	倾注平板法	178
14.5.2	平板涂布法	178
14.5.3	膜过滤	179
14.6	生物荧光	181
14.7	比浊法和光密度	181
第15章	葡萄酒酿造微生物鉴定	183
15.1	引言	183
15.2	微生物鉴定	183
15.3	酵母与霉菌	184
15.3.1	碳、氮源的吸收利用	186
15.3.2	子囊孢子的证明	189
15.3.3	菌丝体/假菌丝体的鉴定	191
15.3.4	糖类的发酵	192
15.4	细菌	192
15.4.1	精氨酸生成氨	193
15.4.2	过氧化氢酶	194

15.4.3	葡聚糖与蔗糖	195
15.4.4	糖类发酵	195
15.4.5	葡萄糖产气	197
15.4.6	革兰染色	199
15.4.7	生酮作用	200
15.4.8	葡萄糖生成乳酸	200
15.4.9	苹果酸的利用 (监测苹果酸 - 乳酸发酵)	202
15.4.10	果糖生成甘露醇	204
15.4.11	乙醇的氧化	204
15.4.12	乳酸的氧化	205
第 16 章	其他鉴定与计数方法	207
16.1	导言	207
16.2	表型鉴定	207
16.2.1	Biolog 系统	207
16.2.2	脂肪酸甲酯分析	208
16.2.3	蛋白质特性	208
16.2.4	同工酶 (酶谱) 的电泳特点	208
16.3	免疫化学法	209
16.3.1	酶联免疫分析	209
16.3.2	免疫荧光显微镜	210
16.4	系统分析	210
16.4.1	聚合酶链式反应	212
16.4.2	凝胶电泳	213
16.4.3	定量聚合酶链式反应	213
16.4.4	杂交探针	213
16.4.5	荧光原位杂交	214
16.4.6	核糖核酸分析	214
16.5	探针检测系统	214
16.5.1	Taq Man [®] 探针	214
16.5.2	分子信标	215
16.5.3	Scorpion 探针	216
16.5.4	肽核酸化学发光原位杂交探针	216
16.6	其他分子方法	216
16.6.1	限制性内切酶片段长度多态性	217
16.6.2	脉冲场凝胶电泳	217

16.6.3 其他方法	217
16.7 染色体外的元件（卫星 DNA）	218
第 17 章 化学和物理不稳定性	219
17.1 引言	219
17.2 结晶不稳定性	219
17.2.1 酒石酸盐	219
17.3 类结晶不稳定性	221
17.3.1 软木屑	221
17.3.2 硅藻土	222
17.4 纤维状物不稳定性	222
17.5 无定形物不稳定性	223
17.5.1 蛋白质	223
17.5.2 多酚类物质	224
17.5.3 葡聚糖、果胶和淀粉	225
17.5.4 金属危害	226
第 18 章 实验室布置	228
18.1 引言	228
18.2 显微镜和 pH 计	229
18.3 灭菌锅	229
18.4 离心机和过滤器	229
18.5 培养箱	230
18.6 水浴锅	230
18.7 玻璃和塑料制品	230
18.8 培养基	231
18.9 光度计	231
18.10 层流净化罩	232
18.11 其他方面	232
第 19 章 实验室安全	234
19.1 引言	234
19.2 伤害和疾病预防措施	234
19.2.1 培训	234
19.2.2 信息	235
19.2.3 交流	236
19.2.4 眼睛清洗和安全淋浴处	237
19.2.5 火灾警报器和预防措施	237

19.2.6	急救	237
19.2.7	个人防护装备	238
19.3	安全示例	239
19.3.1	生物危害和化学废弃物	239
19.3.2	电源	239
19.3.3	热和蒸汽	240
19.3.4	机械的防护措施	240
19.3.5	储存	240
19.3.6	紫外线	240
术语表		242
参考文献		249



第一篇

葡萄与葡萄酒酿造的微生物



第 1 章 酵母

1.1 引言

对于葡萄酒酿造者而言，酵母是最重要的微生物菌群。如果没有酿酒酵母 (*Saccharomyces*)，就不可能酿造出优质的葡萄酒。但除了酿酒酵母，葡萄酒酿造还需要其他多种微生物的参与，这些微生物将最终提高或降低葡萄酒的质量 (Fleet 和 Heard, 1993; Fugelsang 等, 1993; Deak 和 Beuchat, 1996; Loureiro 和 Malfeito - Ferreira, 2003)。

1.2 繁殖

在属水平上对酵母进行分类，需要说明酵母在生活周期中是否存在有性阶段。性孢子又被称为子囊孢子，能萌发形成具有活力的芽殖酵母。若酵母在生活周期中不能形成性孢子，则根据其无性（不完全）形式进行分类鉴定，而性孢子的出现是酵母具有有性（完全）形式的佐证。除了形成孢子之外，有性形式和无性形式在其他标准（如利用特定含氮化合物、发酵特定糖类物质等）上是相同的。

1.2.1 有性繁殖

虽然目前推测，自然界中酵母也能进行有性繁殖，但实验室中需要在特殊培养基上进行培养才能实现酵母的有性繁殖（见 15.3.2）。对于分离获得的酵母菌种进行全面的鉴定，要求证实其存在有性阶段。无法获得酵母的性孢子时进行分类鉴定，结论有可能是错误的。许多因素能影响孢子的形成。首先，自然界中孢子接合是周期性循环进行的，就是说绝大多数活动在相对较短的时间内发生；或者孢子形成过程很短暂，性孢子快速发芽形成具有活力的酵母，可能导致实验室人员无法选择合适的时期进行观察。其次，分离到的酵母菌种是异宗配合的单倍体，且孢子接合所需的适合杂交类型在培养物中可能不存在。最后，化学因素（如高浓度葡萄糖）或物理条件（如温度）会抑制酵母的有性阶段。

1.2.2 无性繁殖

芽殖是最常见的繁殖方式，特别在葡萄汁或葡萄酒中，芽殖是酵母的唯一繁殖方式。母细胞在出芽时先形成芽蕾，直至最后分离形成子代细胞。条件适宜时，单个母细胞能够在培养周期中多次出芽。但当营养条件有限时，酵母细胞只能出芽3~4次。另外，细胞膜前体的形成需要消耗氧，氧就成为限制细胞进一步繁殖的因素。

酵母具有多种芽殖方式，可作为菌种鉴定的依据。从发酵和陈酿阶段的葡萄酒中分离到的酵母，最常见的形式是多边芽殖和两端芽殖。偶尔也能分离到通过形成横隔进行分裂繁殖的酵母。

1.2.2.1 多边芽殖

多边芽殖在酵母的“肩部”发生，每个芽蕾的出现相互独立。如图1.1所示，子细胞脱落后，酿酒酵母在显微镜下可观察到芽痕。在发酵过程中的生长阶段，由于每次出芽和分裂都会消耗掉母细胞近一半的细胞壁，芽殖的不断进行，就会引发相应的问题。因为细胞壁的合成需要在有氧条件下进行，因此氧就限制了无性繁殖过程。这就导致了大部分发酵主要依靠稳定期（非芽殖阶段）的酵母来完成。

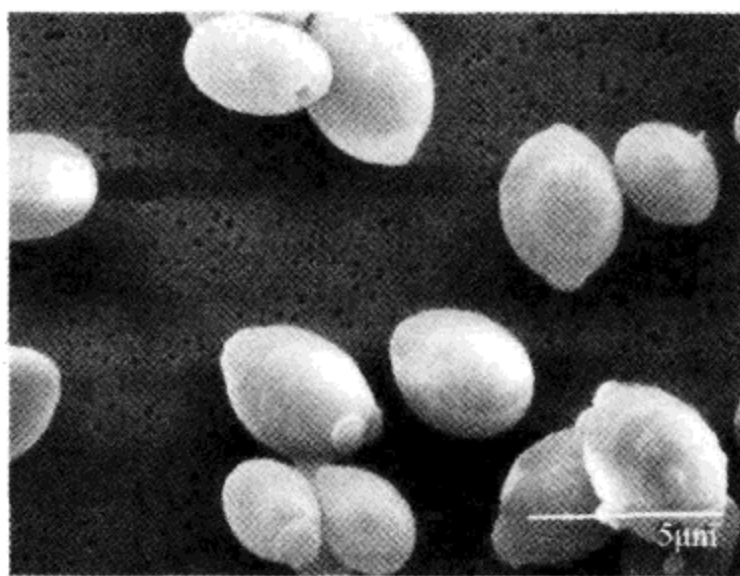


图 1.1 子细胞脱落后，酿酒酵母显现出典型的芽痕（图片由 Lallemand Inc 提供）

根据培养代数、生理状态、培养的物理和化学条件，芽殖方式将有所改变。例如，德克酵母（*Dekkera*）/酒香酵母（*Brettanomyces*）通常以多边芽殖方式进行无性繁殖。然而，菌龄较大的细胞呈现出的形态，却暗示可能进行两端芽殖。因此，在显微镜下，有些细胞呈矩形，另一些是“船形”，进而可能形成假菌丝体。

1.2.2.2 两端芽殖

与多边芽殖不同，一些在葡萄酒酿造早期发现的自然菌种，是在同一位

置重复出芽进行繁殖。因为这些酵母能够在一端或两端出芽，所以称为两端芽殖。克勒克酵母（*Kloeckera*）和类酵母（*Saccharomycodes*）可以在任何一端出芽，导致母细胞形成了典型的顶端尖形（柠檬状）的外形（见图1.2）。

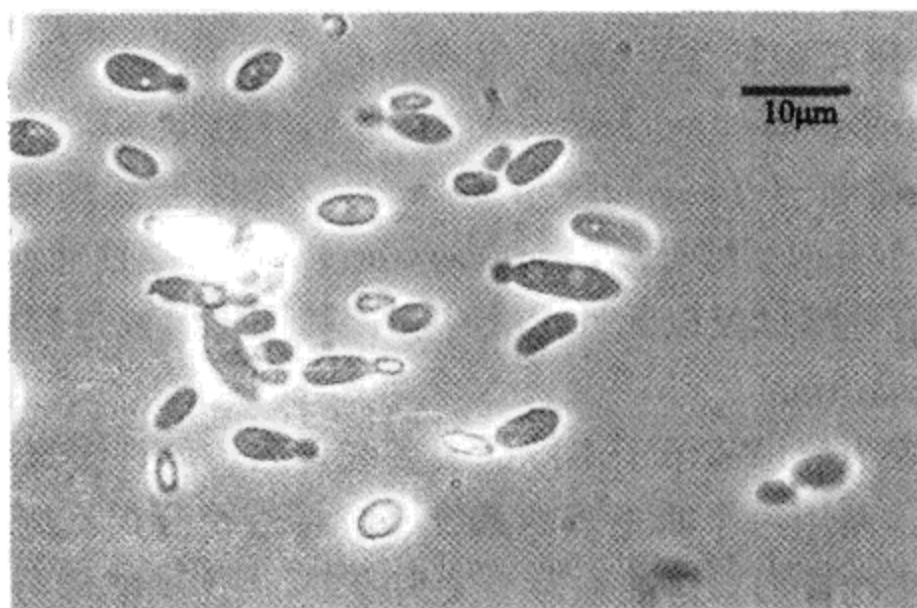


图 1.2 相差显微镜下观察到的柠檬形克勒克酵母（*Kloeckera apiculata*）
（放大倍数：1000×）（照片由 WineBugs LLC 提供）

1.2.2.3 裂殖

裂殖是裂殖酵母属（*Schizosaccharomyces*）的特征，形成子细胞时不会出现芽殖中的收缩过程。分裂过程中，在显微镜下可观察到母细胞和子细胞间先形成类似于细菌的横隔结构，随后进行分裂。

1.2.2.4 假菌丝体

每位酿酒师都有可能观察到葡萄酒表面形成的膜。在有氧条件下，酵母不断地进行芽殖，由于子细胞无法从母细胞上脱离，最终导致酒表面形成了膜。随着时间的推移，母细胞和子细胞间的间距不断收缩，不会形成酵母长链，反而转变成类似霉菌的多细胞纤维结构。形成的假菌丝体大小有所不同，可能是几个细胞粘连在一起，母细胞和子细胞间距明显收缩，也可能是拉长的干细胞密集地排列在一起，明显区别于旁边的卵形芽蕾。在后者中，细胞能自身延伸，形成更远的支链结构。增殖不仅可以由主链上细胞的生长引起，也可以是由于侧链细胞的出芽和分支，最终快速形成覆盖葡萄酒表面的膜。

虽然葡萄酒酵母有几个菌种，如酿酒酵母，都具有这种生长方式，但假菌丝体的形成仍能作为菌种鉴定的依据。可用章节 12.6 中所叙述的玻璃培养方法来证明是否能形成假菌丝体。

1.3 分类

为把能否产生子囊孢子的酵母区分开，真菌学者利用双重分类法进行分类。然而，有性态/无性态术语的合并通常是不同的。比如，无性的/有性的，或有性态的/无性态的酵母包括德克酵母 (*Dekkera*) /酒香酵母 (*Brettanomyces*)、美极梅奇酵母 (*Metschnikowia pulcherrima*) /菌膜假丝酵母 (*Candida pulcherrima*)、葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*) /柠檬形克勒克酵母 (*Kloeckera apiculata*)、德尔布有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*) /西弗假丝酵母 (*Candida colliculosa*)。有些酵母仅以无性形式存在，其孢子形成过程仍需论证 (如酿酒假丝酵母 *Candida vini*)。

尽管分类学家为酵母赋予了不同的属名和种名，但许多酿酒师根据酵母的形态和其他特性，利用一个非正式的系统对酵母进行分类。例如，由于柠檬形克勒克酵母细胞呈柠檬形态，被称为“尖头酵母”。这种酵母与葡萄醪中存在的其他菌种，如假丝酵母 (*Candida*)、隐球菌 (*Cryptococcus*)、德巴利酵母 (*Debaryomyces*)、汉森酵母 (*Hansenula*)、伊萨酵母 (*Issatchenkia*)、克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)、梅奇酵母 (*Metschnikowia*)、毕赤酵母 (*Pichia*) 和红酵母 (*Rhodotorula*) (见 6.2.1)，因为通常从葡萄园或酿造厂分离到这些酵母，它们也被称为“本地的”、“自然的”或“野生的”酵母。一些酿酒专家反对使用这些术语，因为有些“非本地的”或“非自然的”酵母不能被归入这个类群 (如酿酒酵母或酒香酵母)。目前，“非酿酒酵母”这个术语被更广泛地用于描述葡萄醪中存在的非酿酒酵母属的酵母菌种。

根据这种非正式系统，也对酒精发酵中或发酵结束后分离到的酵母进行分类。例如，主导发酵的酵母 (酿酒酵母属)，根据代谢特性有时被称为“发酵酵母”。葡萄酒的陈酿阶段，一些酵母 (假丝酵母、汉森酵母和毕赤酵母) 在有氧情况下能够生长于葡萄酒表面。葡萄酒表面形成的膜通常与酵母引起的腐败有关，这些酵母都被称为“膜酵母” (见 11.2.3)。

偶尔可从葡萄或葡萄酒的周围环境中分离到被称为黑酵母的出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*)。Phaff 等 (1978) 把短梗霉归入类似于酵母的微生物中。显微镜下，其无性繁殖细胞呈椭圆形，顶端是尖形。多边芽殖，形成菌丝体的能力很强。在琼脂上，早期生长形成的菌落是奶油色或茶褐色。随着培养时间的延长，菌落转变成橄榄绿 (暗示霉菌的污染)，最终变成黑色。在整个生长周期，菌落是黏液样，边缘是条纹状。

下面的内容来源不同，但发酵或氧化同化特定糖的能力这部分内容摘自《酵母》 (Kurtzman, 1998a; 1998b; 1998c; Meyer 等, 1998; Miller 和 Phaff, 1998a; 1998b; Smith, 1998a; 1998b; 1998c; Vaughan - Martini 和 Martini,

1998a; 1998b)。研究结果并不完全, 特定的酵母发酵葡萄糖、葡萄酒中重要的一些糖(如阿拉伯糖和果糖)的能力未有报道。

1.3.1 假丝酵母属 (*Candida*)

在葡萄酒中发现的无性态假丝酵母包括多种微生物, 比如伊萨酵母 (*Issatchenkia*)、克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)、毕赤酵母 (*Pichia*)、梅奇酵母 (*Metschnikowia*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces*)、有孢圆酵母属 (*Torulaspora*)、接合酵母 (*Zygosaccharomyces*) (Deak 和 Beuchat, 1996)。就本身而言, 假丝酵母就是由具有广泛生理特性的微生物组成的群体。例如, 在显微镜下细胞可能呈现圆形、椭圆形、圆柱体形或者伸长状态 (Meyer 等, 1998)。

假丝酵母一般进行多边芽殖。不同的菌种发酵糖的种类和同化硝酸盐的能力有所区别。经过检验, 星形假丝酵母 (*C. stellata*) 发酵和同化葡萄糖、蔗糖和棉籽糖。另一菌种铁红假丝酵母 (*C. pulcherrima*) 能发酵葡萄糖, 但能同化葡萄糖、半乳糖、L-山梨糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、海藻糖、松三糖、D-木糖、N-乙酰-葡萄糖胺、乙醇、甘油、D-甘露醇、D-葡萄糖醇、 α -甲基-D-葡萄糖水杨苷、D-葡萄糖酸盐、琥珀酸盐和十六烷 (Meyer 等, 1998)。

1.3.2 德克酵母属 (*Dekkera*)

许多酿酒师认为, 酒香酵母及其相应的产孢株德克酵母会影响葡萄酒的质量 (见 11.2.2)。全世界该属酵母引起了巨大的经济损失, 不仅会降低葡萄酒等级, 减少收益, 而且会直接损害酒的品质, 致使无法销售。尽管传统观点中对于德克酵母/酒香酵母是负面评价, 但有些酿酒师却提出一定程度的感染对于形成特定风格的葡萄酒是否有益的异议。在这些情况下, 该属酵母被认为在感官的复杂性以及红葡萄酒陈酿过程中起着重要的作用。

20 世纪 50 年代, 首先从法国、南非和意大利的葡萄酒中分离得到酒香酵母 (Sponholz, 1993)。在早期的报道中, van der Walt 和 van Kerken (1959; 1961) 从南非的葡萄酒中发现了该属两种酵母, 即间型酒香酵母 (*B. intermedius*) 和 *B. schanderlii*。虽然有报道, 分离到了德克酵母/酒香酵母属的多个菌种, 但仅有 *D. anomala* (无性阶段: 异酒香酵母 *B. anomalus*)、布鲁塞尔德克酵母 (*D. bruxellensis*) (无性阶段: *B. bruxellensis*)、*B. custersianus*、*B. naardenensis* 和 *B. nanus* (Smith, 1998b) 是目前承认的菌种 (Smith, 1998a; 1998b)。间型酒香酵母、*B. lambicus* 和 *B. schanderlii* 被认为就是布鲁塞尔德克酵母 (Smith, 1998a)。

分离到纯培养物后, 绝大多数实验室依靠显微镜观察细胞形态, 进行菌种鉴定。虽然细胞形态对于菌种鉴定起着一定的作用, 但不能作为最终的标准。根据以往的研究报道, 酵母会根据菌龄、培养条件 and 环境压力, 表现出不同的

细胞形态。例如，酒香酵母在固体培养基上培养时，形态明显区别于橡木桶内陈酿阶段。酒香酵母的细胞形态，通常为船形或尖顶拱形（Smith, 1998a）。在新鲜的培养物中，酒香酵母以尖顶拱形为主；但衰老的细胞更常见的是卵形（见图 1.3）。此外，在特定的种群中，仅有不到 1% 的细胞可以表现出这种形态。

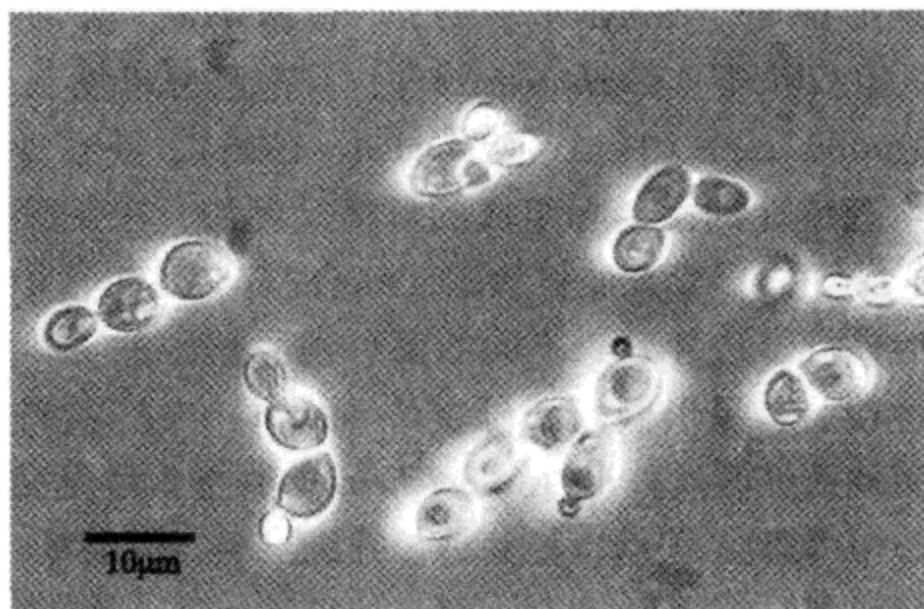


图 1.3 相差显微镜下观察酒香酵母（放大倍数：1000 ×）（照片由 WineBugs LLC 提供）

德克酵母在固体培养基上生长时（见 13.5），菌落呈现白色至微黄色，可能具有光泽、潮湿、平滑，或者是暗淡的、有褶皱。当该属酵母在 20g/L 麦芽汁琼脂培养基上生长时，菌落呈现白色至奶油色，有的有光泽，有的是暗淡的。边缘是完整的叶状（*D. anomala*），或完整的波浪状（布鲁塞尔德克酵母）。孢子是帽状，或近似球形，具有切线边缘。该属酵母都能发酵葡萄糖，而发酵其他碳水化合物如半乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖的能力则取决于菌株的特性。葡萄酒中分离到的菌种，异酒香酵母和 *B. bruxellensis*，能够根据发酵乳糖（异酒香酵母的绝大多数菌株能发酵乳糖，而 *B. bruxellensis* 不具有此特性）和同化琥珀酸（异酒香酵母的绝大多数能同化琥珀酸，而 *B. bruxellensis* 不具有此特性）的能力进行区分。两个菌种都能同化硝酸盐，而且有些酒香酵母能以乙醇作为唯一的碳源和能源（Silva 等，2004）。

德克酵母/酒香酵母在利用葡萄糖生长时将产生大量的醋酸（Freer, 2002）。事实上，如果培养基中无缓冲体系，酵母产生的醋酸足以抑制细胞，并最终杀死菌体。因此，常规的实验室培养基缓冲液中添加 20g/L 碳酸钙，以中和产生的醋酸（见 13.5）。然而，酒香酵母生长缓慢，在固体培养基上需要数天才能形成菌落。

若要成功实现实验室常规鉴定德克酵母和酒香酵母，最主要的困难是证明有性阶段的存在与否。德克酵母形成孢子，需要在培养基中添加多种维生素（见 15.3.2.4）。然而，Ilagan（1979）发现，即使在理想条件下，所观察到的能形成孢子的数量也极少（<1%）。一般认为，酵母在葡萄酒中不能形成孢子，

但从葡萄酒中分离到的不确定菌株被报道为德克酵母/酒香酵母，或仅仅是类似于酒香酵母。

1.3.3 汉逊酵母属 (*Hanseniaspora*)

如图 1.2 所示，汉逊酵母细胞呈卵形、球形（年轻细胞）、尖形、柠檬形（衰老细胞）。该属酵母进行两端芽殖（Smith, 1998c）。每个子囊中含有 1~4 个囊孢子，孢子呈球形、帽形或土星状。葡萄有孢汉逊酵母（*H. uvarum*）（无性阶段：柠檬形克勒克酵母 *Kloeckera apiculata*）是该属在葡萄酒中最常见的菌种，仅能发酵葡萄糖，但能同化葡萄糖、纤维二糖、2-酮-D-葡萄糖酸盐和水杨苷。该属酵母在 100mg/L 放线菌酮浓度中仍能生长。生长时优先利用果糖，其次是葡萄糖（Ciani 和 Fatichenti, 1999）。

1.3.4 伊萨酵母属 (*Issatchenkia*)

该属菌种既能进行多边芽殖，也能形成假菌丝体。每个子囊中形成 1~4 个表面粗糙的囊孢子。伊萨酵母能发酵葡萄糖，但不能同化硝酸盐。从葡萄汁或葡萄酒中能分离到的东方伊萨酵母（*I. orientalis*）（无性阶段：克鲁假丝酵母细胞 *Candida krusei*），其细胞是卵形或长形的。东方伊萨酵母能同化葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、乙醇、丙三醇、DL-乳酸盐和琥珀酸盐（Kurtznab, 1998a）。

1.3.5 梅奇酵母属 (*Metschnikowia*)

与其他酵母相似，梅奇酵母既能进行多边芽殖，又能形成假菌丝。子囊中生成 1~2 个针状囊孢子，末端无附属物。葡萄醪或葡萄酒中分离到的美极梅奇酵母（*M. pulcherrima*）（无性阶段：铁红假丝酵母 *Candida pulcherrima*），能发酵葡萄糖并能同化多种化合物，包括葡萄糖、半乳糖、L-山梨糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、海藻糖、松三糖、D-木糖、N-乙酰葡萄糖胺、乙醇、丙三醇、D-甘露糖、D-葡萄糖醇、 α -甲基-D-葡萄糖、琥珀酸盐和十六烷，但不能同化硝酸盐（Miller 和 Phaff, 1998a）。该属菌种所能同化的氮源包括尸胺、L-赖氨酸、乙胺，能耐受 10mg/L 放线菌酮，但放线菌酮浓度达到 100mg/L 时将完全抑制菌体的生长。有些菌种产生一种棕色或红色的普切明色素（Pallmann 等, 2001）。

1.3.6 毕赤酵母属 (*Pichia*)

毕赤酵母包括多个不同菌种，其中在葡萄酒中发现两种：异常毕赤酵母（*P. anomala*）（无性阶段：菌膜假丝酵母 *Candida pelliculosa*）和膜璞毕赤酵母（*P. membranifaciens*）（无性阶段：粗状假丝酵母 *Candida valida*）。另一个菌种，季也蒙毕赤酵母（*P. guilliermondii*）（无性阶段：高里假丝酵母 *Candida guillier-*

mondii) 也能从葡萄醪或与葡萄醪相接触的葡萄酒酿造厂设备中分离到,但不能从葡萄酒中分离到 (Dias 等, 2003a)。在显微镜下, 细胞呈卵形、椭圆形或圆柱形, 进行多边芽殖。假菌丝体形成比较困难, 有时无法观察到。固体培养基上菌落呈白色或奶油色, 无光泽, 通常有褶皱。囊孢子 (子囊中有 1~4 个) 的形态是球形、半球形、帽形或土星形。

根据不同菌种的特性, 能发酵不同的碳水化合物, 有些能同化利用硝酸盐。异常毕赤酵母能发酵葡萄糖、蔗糖, 同化葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、海藻糖、棉籽糖、松三糖、可溶性淀粉、乙醇、丙三醇、赤藻糖醇、D-甘露糖、D-葡萄糖醇、 α -甲基配糖体、水杨苷、DL-乳酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐和硝酸盐 (Kurtzman, 1998b)。膜璞毕赤酵母发酵葡萄糖的能力较弱, 能同化的化合物种类远少于异常毕赤酵母 (葡萄糖、N-乙酰-D-葡萄糖胺、乙醇)。

异常毕赤酵母以前被分类为异常汉逊酵母 (*Hansenula anomala*) (Deak 和 Beuchat, 1996), 发酵能力有限, 但能像产膜酵母一样进行氧化分解代谢。在发酵过程中, 异常毕赤酵母能产生 0.2%~4.5% 乙醇, 可以合成大量的乳酸、乙酸乙酯和乙酸异戊酯 (Shimazu 和 Watanabe, 1981)。异常毕赤酵母能消耗利用酸性物质, 降低可滴定酸度, 促进 pH 的升高 (Sponholz, 1993)。

1.3.7 酿酒酵母属 (*Saccharomyces*)

如 Vaughan - Martini 和 Martini 所述 (1998a), 在显微镜下酿酒酵母细胞呈球形或卵形, 多边芽殖, 可能形成假菌丝 (见图 1.4)。酿酒酵母能形成 1~4 个平滑的椭圆形孢子。菌落是光滑的, 通常是扁平的, 有时是突起的, 不透明的。贝酵母 (*S. bayanus*) 和酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) (无性阶段: 粗壮假丝酵母 *Candida robusta*) 是葡萄酒中发现的两个主要的菌种, 能发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、棉籽糖和乙醇, 但不能同化硝酸盐。酿酒酵母不能利用五碳糖 (戊糖)。

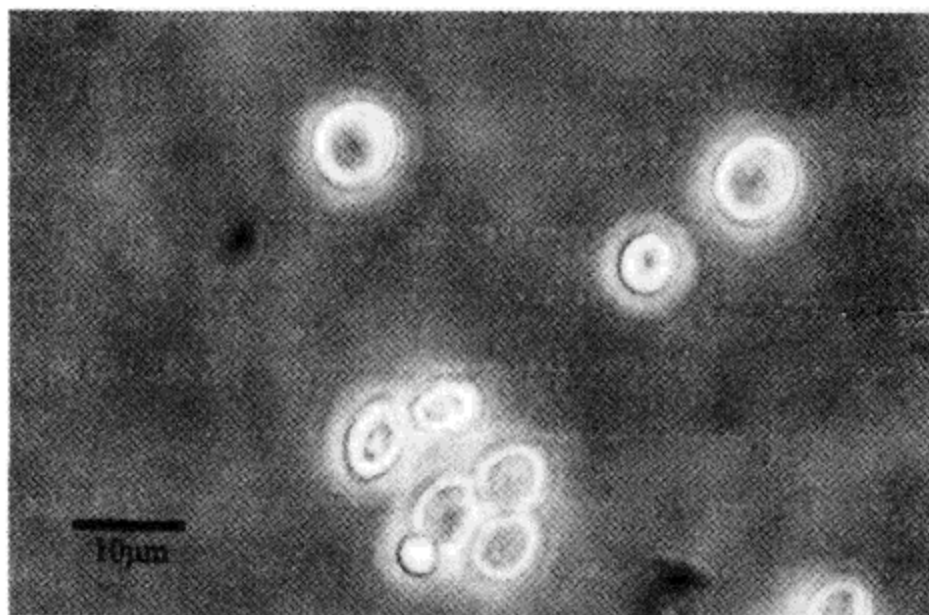


图 1.4 相差显微镜下观察酿酒酵母 (放大倍数: 1000 \times) (照片由 WindBugs LLC 提供)

多年来,酿酒酵母的分类方法发生了巨大变化 (Vaughan - Martini 和 Martini, 1998a)。实际上, Vaughan - Martini 和 Martini (1998a) 列出了酿酒酵母的 97 个同义词。例如, 卡氏酵母 (*S. carlsbergensis*) 最初被分类为葡萄汁酵母 (*S. uvarum*), 此后被分类到 *S. cerevisiae* race *uvarum*, 最后被归为巴斯德酵母 (*S. pastorianus*)。目前认为, 酿酒酵母和贝酵母可能是两个不同的菌种 (Vaughan - Martini 和 Martini, 1998a), 或是同一菌种具有少许差异, 所以被分成不同的小种 (Boulton 等, 1996)。

1.3.8 类酵母属 (*Saccharomycodes*)

该属仅有一个菌种, 路德类酵母 (*S. ludwigii*), 细胞形态呈末端平滑的柠檬形、香肠形、弓形, 或者中部鼓起的长条形 (见图 1.5)。有时以单个细胞存在, 有时成对或三个成群存在 (Miller 和 Phaff, 1998b)。两端芽殖。类酵母产生 1 ~ 4 个光滑的球形孢子, 表面的副赤道处有一小突起。它所能发酵的糖类包括葡萄糖、蔗糖、棉籽糖, 能同化的糖类是葡萄糖、蔗糖、棉籽糖、甘油、尸胺和乙胺, 但不能同化硝酸盐。当放线菌酮浓度在 1mg/L 时, 对类酵母的生长无影响, 但当浓度达到 10mg/L 时, 表现出明显的抑菌效果。

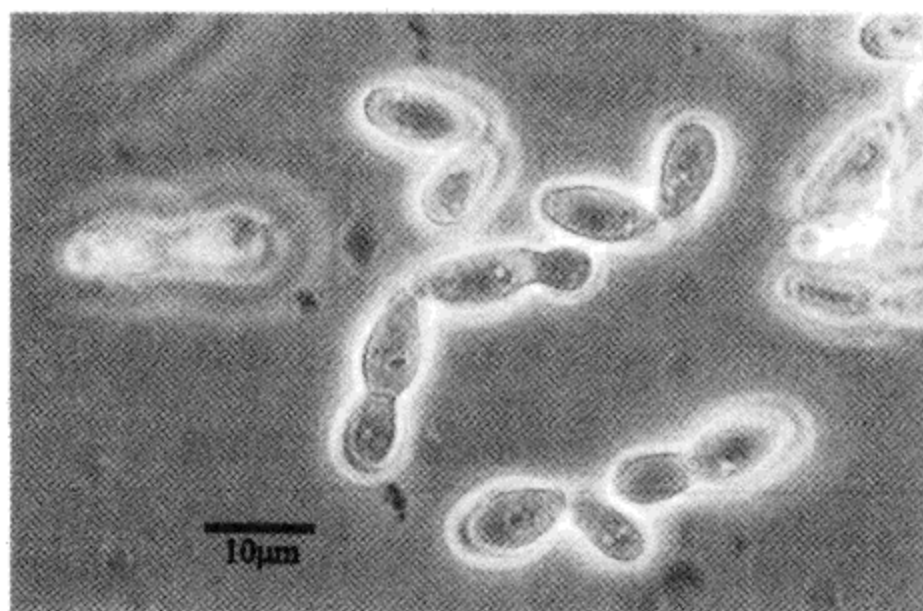


图 1.5 相差显微镜下观察路德类酵母 (放大倍数: 1000 ×) (照片由 WindBugs LLC 提供)

1.3.9 裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)

裂殖酵母的细胞可能是圆柱形、卵形, 甚至球形 (Vaughan - Martini 和 Martini, 1998b)。葡萄汁或葡萄酒中分离到的酵母中, 只有该属酵母通过裂殖方式进行繁殖, 形成菌丝体, 子囊中出现 2 ~ 8 个球形或椭圆形的囊孢子。粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) 是葡萄醪或葡萄酒中主要的菌种, 能够发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖, 能利用的糖类物质包括葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、棉籽糖和 D - 葡萄糖酸盐。培养粟酒裂殖酵母时不能以乙醇作为碳源, 也不能以硝酸盐作为唯一氮源。

1.3.10 接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*)

接合酵母属共包括 9 个菌种 (Kurtzman, 1998c), 其中拜耳接合酵母 (*Z. bailli*)、*Z. bisporous*、鲁氏接合酵母 (*Z. rouxii*) 和 *Z. florentinus* 是从葡萄醪或葡萄酒中分离到的, 而鲁氏酵母 (*Saccharomyces rouxii*) 和巴格式接合酵母 (*Z. barkeri*) 是鲁氏接合酵母的同义词 (Deak 和 Beuchat, 1996)。

在显微镜下, 接合酵母细胞呈球形、椭圆形, 因多边芽殖或者假菌丝导致形成拉长的形态 (Kurtzman, 1998c)。囊孢子是光滑的球形或椭圆形, 子囊里有 1~4 个孢子。不同的菌种所能发酵利用的糖类是不同的, 但都不能同化硝酸盐。鲁氏接合酵母能发酵葡萄糖、麦芽糖, 同化葡萄糖、海藻糖、丙三醇、D-甘露糖、D-葡萄糖醇。

利用不同的培养基进行菌种分离时, 菌落和细胞形态将有所变化, 但拜耳接合酵母在显微镜下通常呈卵形或圆柱形。酵母在多边芽殖时形成简单的假菌丝体。接合酵母是单倍体、异宗配合型, 这意味着两个不同接合型的孢子接合后, 才能形成孢子。子囊呈棒状 (拜耳接合酵母) 或哑铃形 (*Z. bisporus*)。每次接合产生两个光滑、圆形的子囊孢子。

与其他许多酵母不同, 接合酵母能在高渗透压环境中生存, 如 60% 葡萄糖溶液 (Thomas, 1993)。而且该属酵母对于葡萄汁、浓缩汁和葡萄酒厂中常用的防腐剂具有很强的耐受性 (见表 1.1)。接合酵母对 SO₂ 的耐受性, 目前认为是由于合成了能与胞外亚硫酸盐结合的化合物如乙醛, 以及其他尚未确认的机制 (Deak 和 Beuchat, 1996)。众所周知, 接合酵母也能耐受酒精, 能在 18% (体积分数) 的葡萄酒中生存 (Thomas 和 Davenport, 1985)。

表 1.1 不同化合物对接合酵母的抑菌浓度

化合物	浓度
醋酸	>2.5% (体积分数)
苯甲酸	>1000mg/L
乙醇	>20% (体积分数)
抑菌 pH	<2, >7
山梨酸	>800mg/L
糖	>70% (体积分数)
SO ₂	>3mg/L

注: 摘自 Thomas 和 Davenport (1985), 由 Elsevier Ltd 提供。

1.4 所需营养物质

与其他微生物相似, 酵母生长需要多种营养物质, 包括碳源 (糖)、氮源 (氨或氨基酸), 不同的生长限制因子, 如维生素和金属元素。

1.4.1 氮

酵母在葡萄醪中进行酒精发酵所需的营养成分中，最重要的可能是氮（见8.2）。酵母能从有机氮（氨基酸）或无机氮（氨或 NH_4^+ ）中同化氮。无机氮被转变成有机氮的形式，需要谷氨酸脱羧酶催化中间体 α -酮戊二酸生成谷氨酸（见图1.6）。生成的谷氨酸随之被细胞用于合成其他氨基酸，这些氨基酸在新陈代谢过程中起着重要的作用。

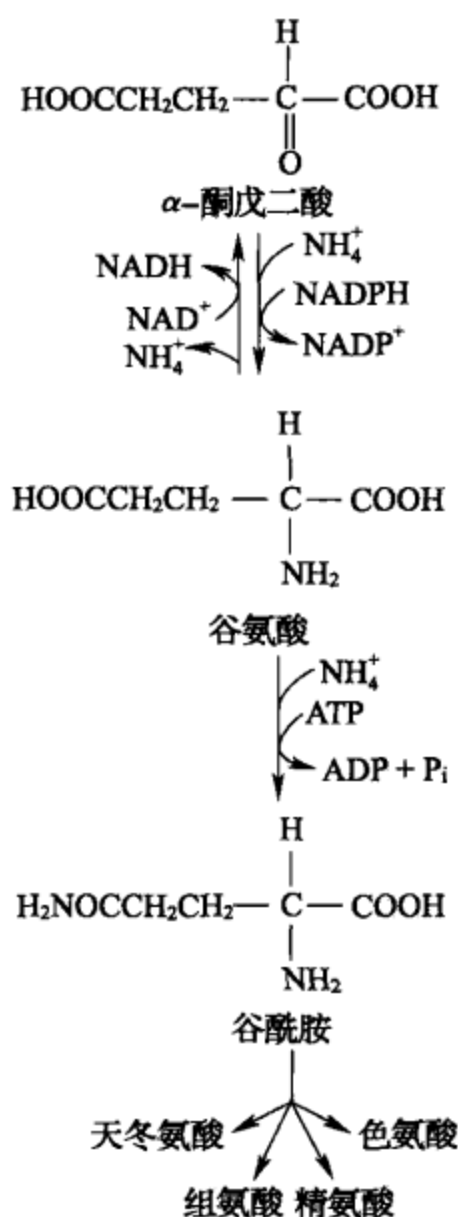


图 1.6 酿酒酵母通过氨和 α -酮戊二酸的反应同化无机氮元素

通过定量分析，精氨酸是酿酒酵母在葡萄、未发酵葡萄汁和葡萄醪中所需的最重要的氨基酸（Spayd 和 Andersen - Bagge, 1996；Stines 等, 2000）。在发酵起始阶段，酵母快速同化精氨酸，而在自溶阶段又把精氨酸释放到葡萄酒中。分解代谢产生的中间产物被用于细胞繁殖和形成 ATP，尿素是该途径中的一个副产物，它能与乙醇反应生成乙基氨基甲酸酯（见 11.3.2）。

1.4.2 生长限制因子

以干重计，酿酒酵母含有 3% ~ 5% 磷酸盐、2.5% 钾、0.3% ~ 0.4% 镁、0.5% 硫和痕量的钙、氯、铜、铁及锰（Monk, 1994；Walker, 1998）。培养酵

母时必须提供外源性的磷酸盐，磷酸盐被用于合成氨基酸、磷脂、5'-三磷酸腺苷（ATP）和其他化合物。钾是细胞吸收磷酸盐时必需的元素，钾缺乏将导致酒精发酵迟缓（Kudo 等，1988）。酿酒酵母需要的其他金属元素在发酵过程中所起的作用各有不同，但主要是作为酶蛋白的激活剂。

除了金属离子，酵母还依据种属特性和特异的生长条件，需要不同的维生素，如硫胺素、核黄素、泛酸、维生素 B₆、烟碱、生物素、肌醇（Monk, 1994; Ough 等，1989a）。通常而言，酿酒酵母中几乎所有菌株都需要生物素和泛酸，某些菌株还需要肌醇和硫胺素（Walker, 1998）。丙酮酸的羧化过程以及氨基酸、蛋白质和脂肪酸的合成均需要生物素。泛酸是辅酶 A 的基本组分，辅酶 A 是糖、脂代谢所必需的因子。泛酸缺乏将导致形成 H₂S（见 8.5.2）。虽然脱羧反应需要硫胺素，但有些酵母能自身合成硫胺素，所以不一定需要外源添加硫胺素。SO₂能降解硫胺素，减少维生素含量。最后，NAD⁺和 NADP⁺的合成需要烟酸，而细胞分裂需要肌醇。酿酒酵母属之外的酵母所需的营养要求千差万别。

不同的商品化葡萄酒酵母菌株，不仅对氮的需求有所差异，而且对氧也是如此（Julien 等，2000）。虽然酿酒酵母在厌氧条件下也能生长，但生存能力有限。有些代谢产物的合成，必须在有氧条件下才能进行，如羊毛甾醇、麦角甾醇、不饱和脂酰 CoA 酯（Walker, 1998; Ribéreau - Gayon 等，2000），这些物质统称为限制因子（Lafon - Lafourcade 等，1979）。向澄清的葡萄醪中添加麦角甾醇，能促进酒精发酵（Houtman 等，1980b）。甾醇类物质是维持膜通透性所必需的，所以能够提高酵母的生存能力，并延长酵母的发酵活性（Lafon - Lafourcade 等，1979）。在有氧条件下，甾醇也会影响挥发性物质的合成（Mauricio 等，1997）。发酵时向葡萄醪中加入酵母菌皮，也可提供发酵所需的限制因子（Munoz 和 Ingledew, 1989a; 1989b）。

葡萄可提供酵母厌氧生长所需的部分脂类物质。有些葡萄品种的表皮蜡状物中油酸能占到 2/3，可以代替麦角甾醇以满足酵母厌氧生长所需（Brechot 等，1971）。

对氧的需求，绝大多数非酿酒酵母要高于酿酒酵母，以维持菌体的生长。通常在葡萄酒的表面发现部分非酿酒酵母，这也反映了它们在氧化代谢方面的差异（见 11.2.3）。

1.5 新陈代谢

1.5.1 葡萄糖

酵母分解糖类物质（如葡萄糖）以 ATP 形式产生能量。ATP 水解成 ADP（5'-二磷酸腺苷）和 Pi（无机磷），释放出的能量主要用于细胞的各种反应和转变。

葡萄糖通过 EMP 途径（又称糖酵解途径）中的一系列反应被分解利用（见图 1.7）。经过一系列生化反应，葡萄糖被分解，释放出两种三碳化合物，即3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮。三碳糖再继续转变成丙酮酸，丙酮酸依次脱羧和还原，形成 CO₂和乙醇。总之，一分子葡萄糖经过糖酵解，产生两分子 ATP 和两分子还原性辅酶 NADH。

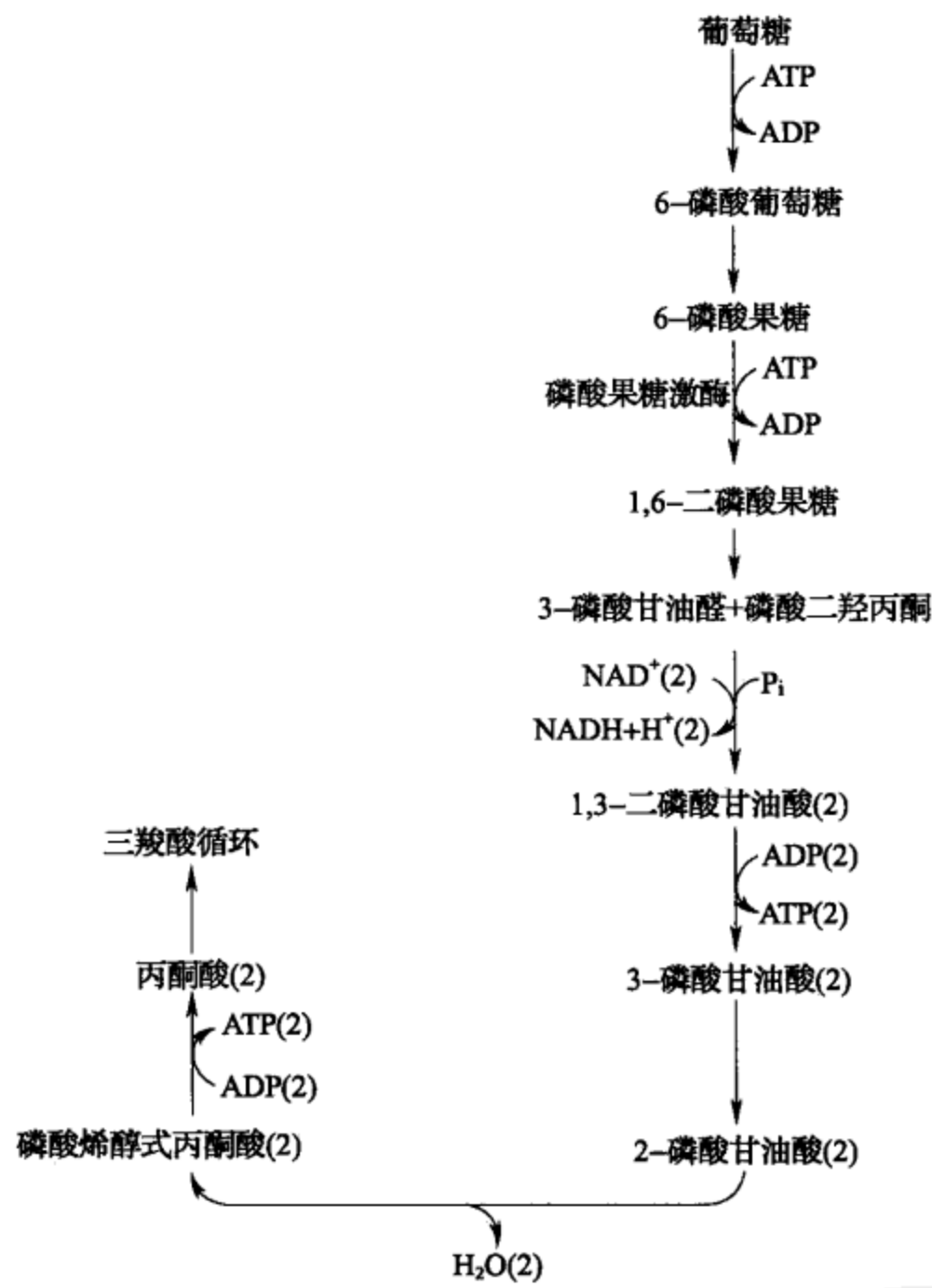


图 1.7 酿酒酵母利用葡萄糖的 EMP 途径或糖酵解途径

在某些条件下，糖酵解中形成的二羟丙酮能够通过 3-磷酸甘油还原成甘油（见图 1.8），同时氧化一分子 NADH 生成 NAD⁺。当发酵过程中细胞缺乏 NAD⁺ 时，由于该反应能提供 NAD⁺，所以更为重要。如果乙醛与 SO₂ 反应生成结合态 SO₂，就不能被还原成乙醇，此时有利于甘油的生成（见 5.2.1）。

在有氧条件下，糖酵解中形成的丙酮酸进入

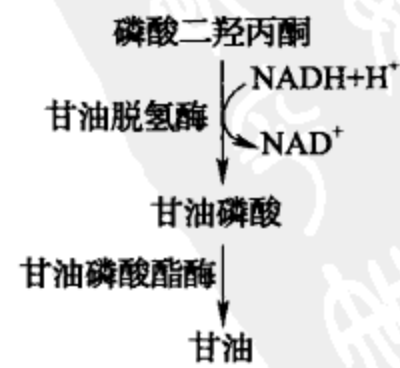


图 1.8 二羟丙酮还原成甘油，同时 NADH 氧化成 NAD⁺

TCA 循环（见图 1.9）。最初，丙酮酸羧化成草酰乙酸，或直接被用于生成乙酰 CoA。草酰乙酸与乙酰 CoA 继续反应，获得第一个产物柠檬酸。经过一轮 TCA 循环，以 CO_2 形式释放 1 个碳原子，生成一分子还原型辅酶（NADH 和 FADH_2 ），产生一分子 GTP。

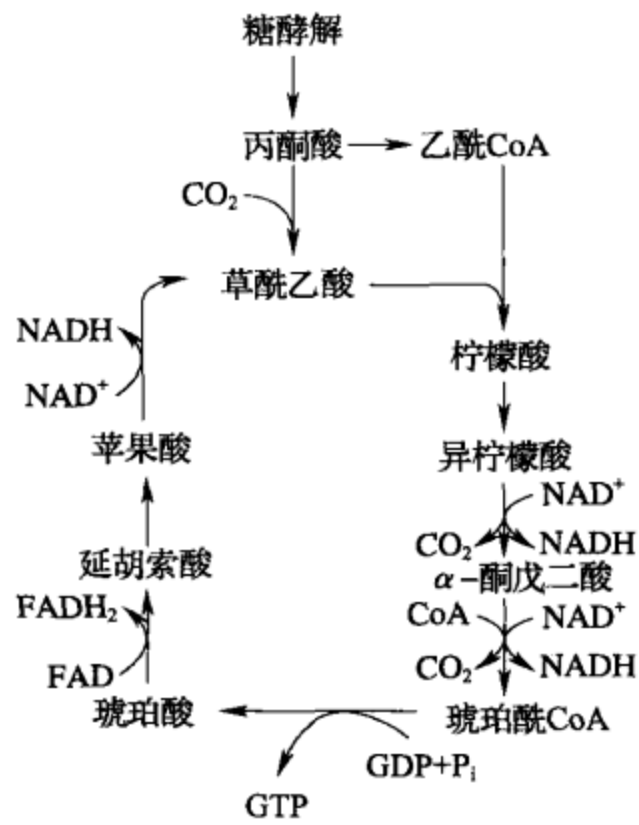


图 1.9 TCA 循环

通过复杂的氧化磷酸化反应，糖酵解途径和 TCA 循环中产生的 NADH 和 FADH_2 再次被氧化成 NAD^+ 和 FAD 。氧化磷酸化反应中细胞色素将电子转移给最终的电子受体 O_2 ，生成 H_2O 。因为需要氧的参与，这些反应仅在在有氧条件下进行。在这些反应中，每氧化 1 分子 NADH，膜结合酶（ATP 合成酶）产生 3 分子 ATP（氧化 1 分子 FADH_2 ，产生 2 分子 ATP）。因此，在有氧条件下，细胞分解 1 分子葡萄糖，净获得 38 个 ATP，其中仅有 2 个 ATP 是在糖酵解中形成的。

在无氧条件下，细胞再次氧化还原型辅酶（NADH 和 FADH_2 ）的能力被明显抑制。为实现辅酶再生，细胞的反应途径发生了改变，丙酮酸被还原成乙醛，最终转化成乙醇（发酵过程），乙醛到乙醇的转化反应需要 NADH（见图 1.10）。因此，乙醇的生成需要细胞再次氧化在糖酵解途径中生成的 NADH。

在无氧条件下，某些参与 TCA 循环的酶仍保持活性（见图 1.11）。在发酵过程中，这些额外的代谢途径对于酿酒酵母是非常重要的，不仅可以氧化再生 NADH，而且能够合成细胞功能所需的重要前体物质（如 NH_4^+ 同化反应所需的 α -酮戊二酸）。细胞状况决定是激活还原性途径（发酵）还是氧化性途径（呼吸作用），并产生不同的终产物。

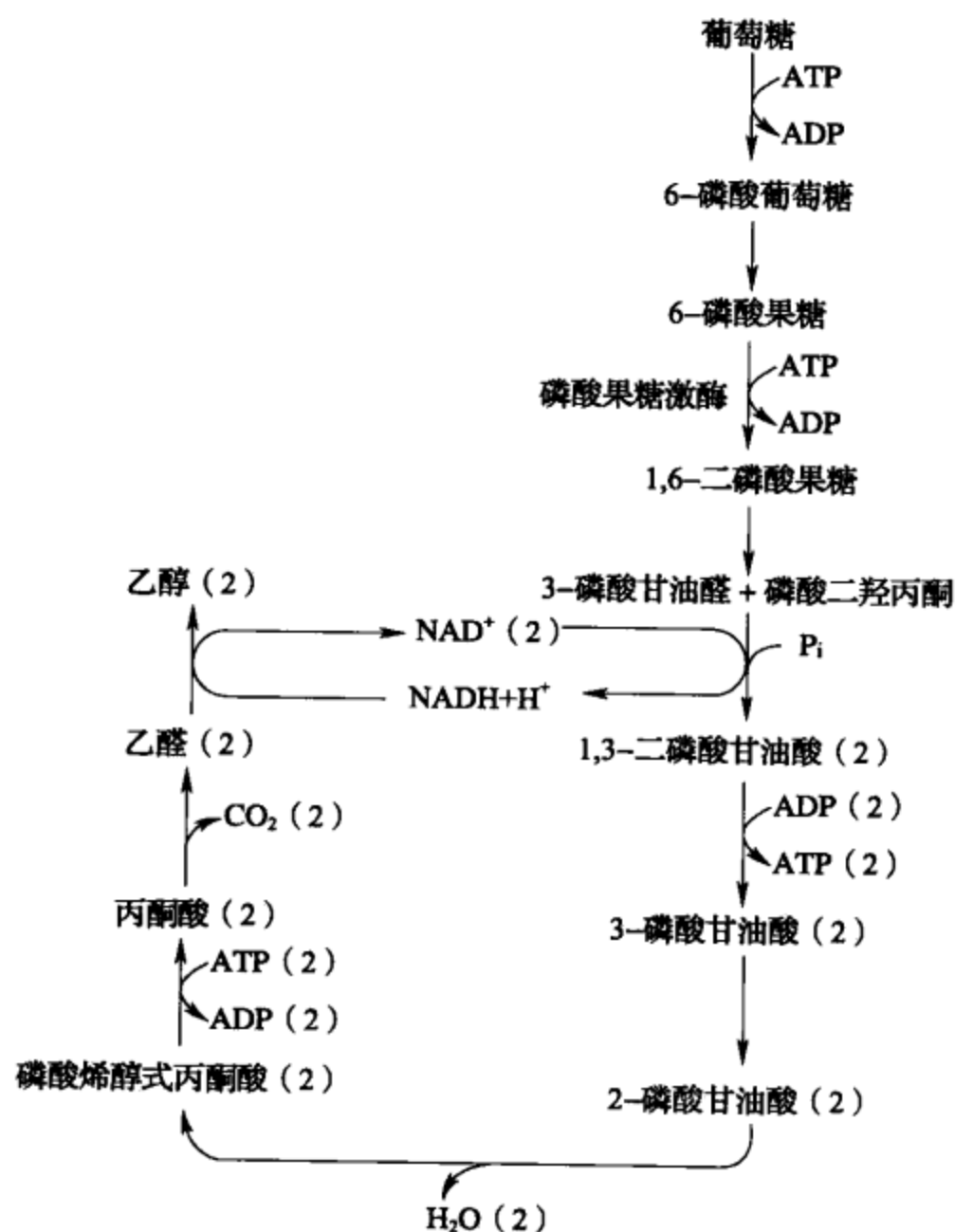


图 1.10 在无氧途径下酿酒酵母利用葡萄糖的途径（发酵过程）

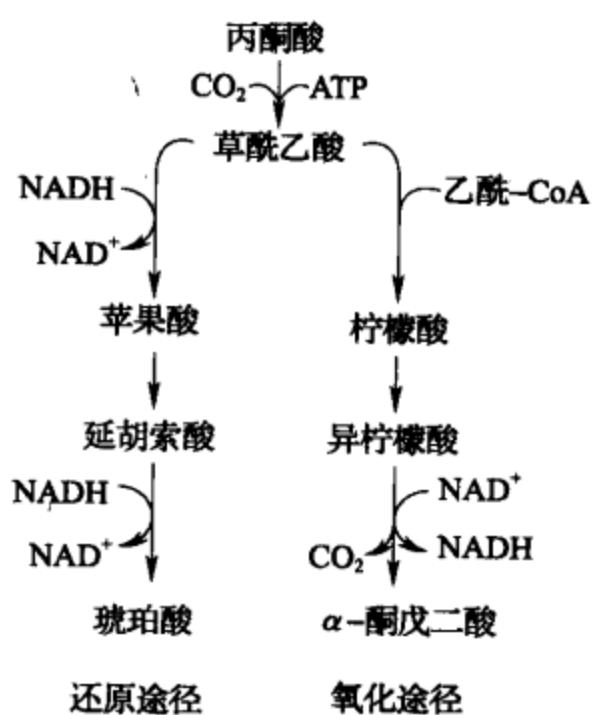


图 1.11 发酵过程中酿酒酵母的 TCA 反应部分 [摘自 Boulton 等 (1999)]

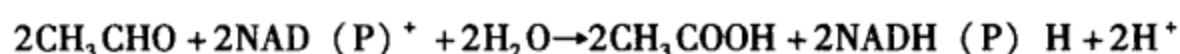
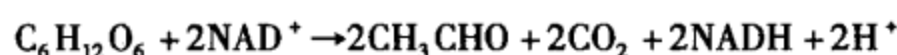
1.5.1.1 Pasteur 效应和 Crabtree 效应

因为在无氧条件下，分解代谢 1 分子葡萄糖仅产生 2 分子 ATP，细胞必须以更快的速度利用额外的葡萄糖，以满足其对 ATP 的需求。这步反应伴随着磷酸果糖激酶的活化（见图 1.10），从而加快了糖酵解中的碳流速。无氧条件下葡萄糖分解速度加快的现象，称为 Pasteur 效应。只有当葡萄糖浓度较低，约 0.9g/L 时才能观察到此现象（Walker, 1998）。

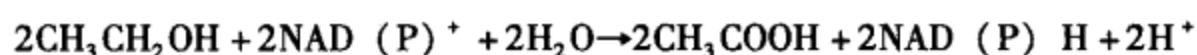
当葡萄糖浓度高于 9g/L 时，酿酒酵母中的 Pasteur 效应被抑制。然而，利用氧继续进行发酵代谢和形成乙醇（Ribéreau - Gayon 等, 2000），这个现象称为 Crabtree 效应。此时，糖酵解中产生的 NADH 一般在形成乙醇（发酵）时被氧化，而不是呼吸作用时被氧化（糖酵解、TCA 循环、氧化磷酸化）。从葡萄酒酿造角度看，Crabtree 效应很重要，因为它在氧气存在时也能继续发酵。在酿酒酵母中可观察到 Crabtree 效应，而在一些非酿酒酵母中未能观察到该现象（Walker, 1998）。

1.5.1.2 Custers 效应

德克酵母/酒香酵母在利用碳水化合物时，具有自身的特殊性。与其他酵母相似，德克酵母/酒香酵母具有糖酵解途径，通过乙醛生成乙醇，产生氧化态辅酶 NAD⁺，当 3-磷酸甘油醛转化成 1,3-二磷酸甘油醛时实现辅酶再生（见图 1.10）。然而，碳水化合物也能通过乙醛氧化成醋酸盐（醋酸），过程如下所示：



酒香酵母产生乙酸的另一个途径是以乙醛为中间体，将乙醇氧化：



由于形成乙酸，NADH 在细胞中积累，必须被氧化再生，以维持 NAD⁺/NADH 平衡。有氧条件下，氧气从 NADH 接收电子，产生 H₂O 和 NAD⁺，实现辅酶再生过程（Walker, 1988）。事实上，供氧量显著影响德克酵母/酒香酵母形成乙酸的数量，所以在有氧条件下，将提高乙酸的产量（Ciani 和 Ferraro, 1997; Aguilar Uscanga 等, 2003）。因为氧有助于维持细胞中 NAD⁺ 的浓度，也能促进碳水化合物氧化过程中形成乙醇，这个现象被称为 Custers 效应（Wijsman 等, 1984; Walker, 1998）。

根据 Ciani 和 Ferraro (1997) 的研究，无氧条件下磷酸二羟丙酮转变成丙三醇的过程促进了 NAD⁺ 的再生（见图 1.8）。事实上，当德克酵母/酒香酵母转入无氧条件，丙三醇途径会暂时被抑制（Wijsman 等, 1984）。由于缺乏 NAD⁺，德克酵母/酒香酵母进行有限的酒精发酵，生成的初级代谢产物是乙醇而不是乙酸（Ciani 和 Ferraro, 1997）。这些酵母在葡萄酒中繁殖时，形成挥发性苯酚，同时也形成 NAD⁺，这是 NAD⁺ 的另一个来源（见 11.2.2）。

1.5.2 硫

微生物需要外界提供硫元素，用来合成含硫的氨基酸和其他重要代谢产物（见图 1.12）。酵母能吸收 SO_2 或 SO_4^{2-} ，但 SO_4^{2-} 转运到细胞中需要消耗能量（Breton 和 Surdin - Kerjan, 1977）。这些含硫分子通过一系列还原反应，最终被还原成 S^{2-} （Rauhut, 1993）。 S^{2-} 或者参与反应合成含硫的有机分子如甲硫氨酸、半胱氨酸，或者以具有刺激性的 H_2S 形式释放出来（见 8.5.2）。这些生化反应中绝大多数是可逆的，所以酵母也能释放 SO_3^{2-} ，其数量依赖于外界条件以及酵母菌株的特性（Larsen 等, 2003）。

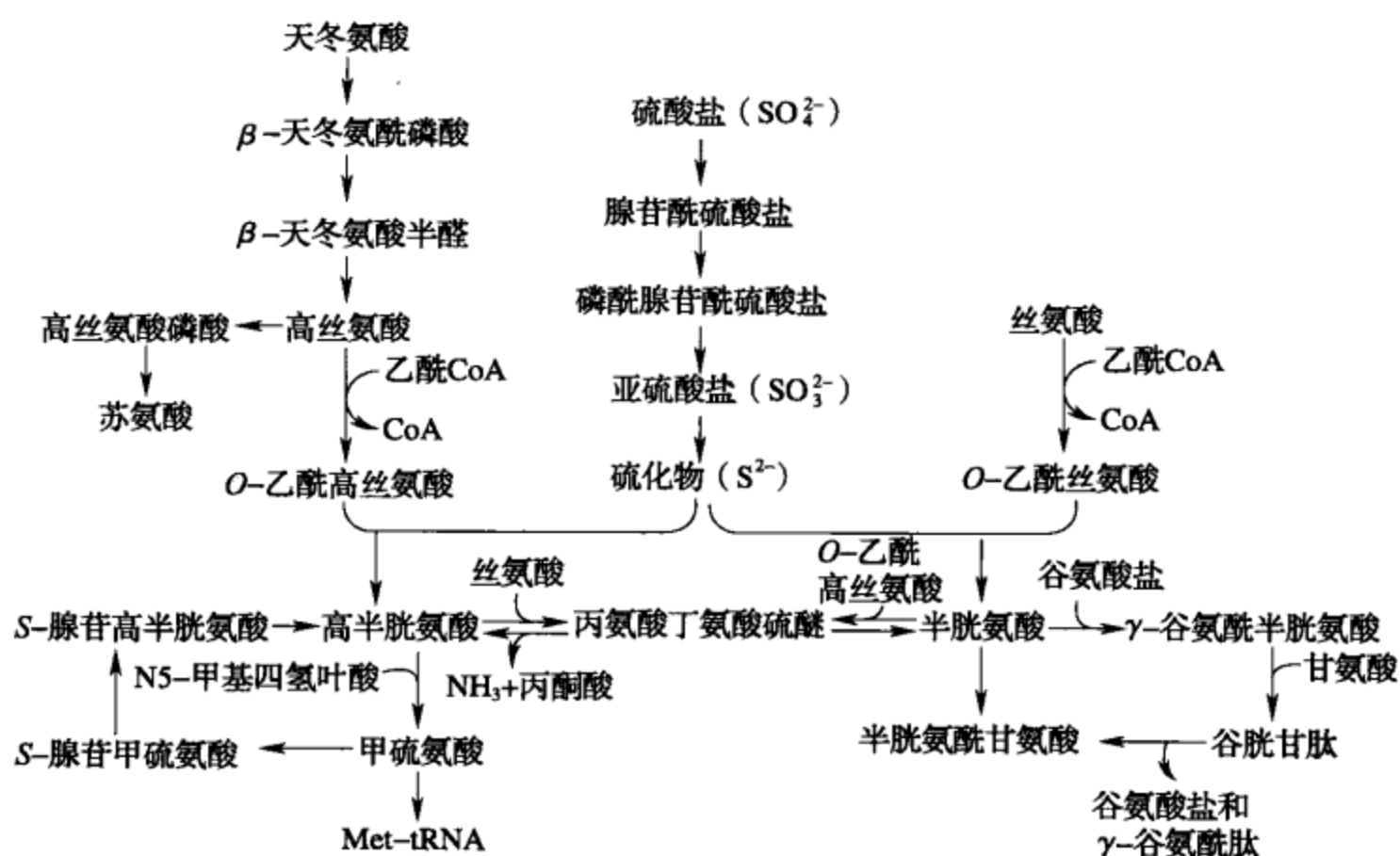


图 1.12 酿酒酵母中的硫代谢途径 [摘自 Wang 等 (2003)]

1.5.3 风味化合物

在发酵过程中，酵母除了形成乙醇和 CO_2 ，还形成了低浓度的次级代谢产物，如丙三醇、琥珀酸、乙酸、乳酸、乙醛以及大量的其他挥发性和非挥发性物质。这些化合物不管是单独作用还是协同作用，都将对葡萄酒的感官特征产生重要影响（Rankine, 1967; Zeeman 等, 1982; Nykäen, 1986; Edwards 等, 1990; Herraiz 等, 1990; Lema 等, 1996）。

含有两个碳以上的醇被称为高级醇或杂醇油。不同的酵母，如假丝酵母、汉逊酵母、毕赤酵母和酿酒酵母，能够产生不同比例的异丁醇、正丙醇、异戊醇和戊醇（Rankine, 1967; Edwards 等, 1990; Holloway 和 Subden, 1991; Webster 等, 1993; Lambrechts 和 Pretorius, 2000），它们对葡萄酒的感官特征具有潜在的重要作用（Rankine, 1967）。常用于杂醇油的感官描述如油味（丁

醇)、酒精味(异丁醇)、杏仁味(戊醇或异戊醇)、花香味或玫瑰花味(苯乙醇)等(Lambrechts和Pretorius, 2000)。

酵母将氨基在氨基酸和 α -酮酸之间进行转移,这种转氨反应可形成高级醇等副产物(见图1.13)。 α -酮酸先脱羧形成醛类,醛再进一步转变成高级醇。如Ehrlich途径所述(Castor和Guymon, 1952),缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苏氨酸将分别转变成异丁醇(2-甲基-1-丙醇)、异戊醇(3-甲基-2-丁醇)、戊醇(2-甲基-1-丁醇)和丙醇(Chen, 1978)。定量分析表明,杂醇油的浓度范围在140~420mg/L,其中异戊醇约占总量的50%(Rankine, 1967; Muller等, 1993)。

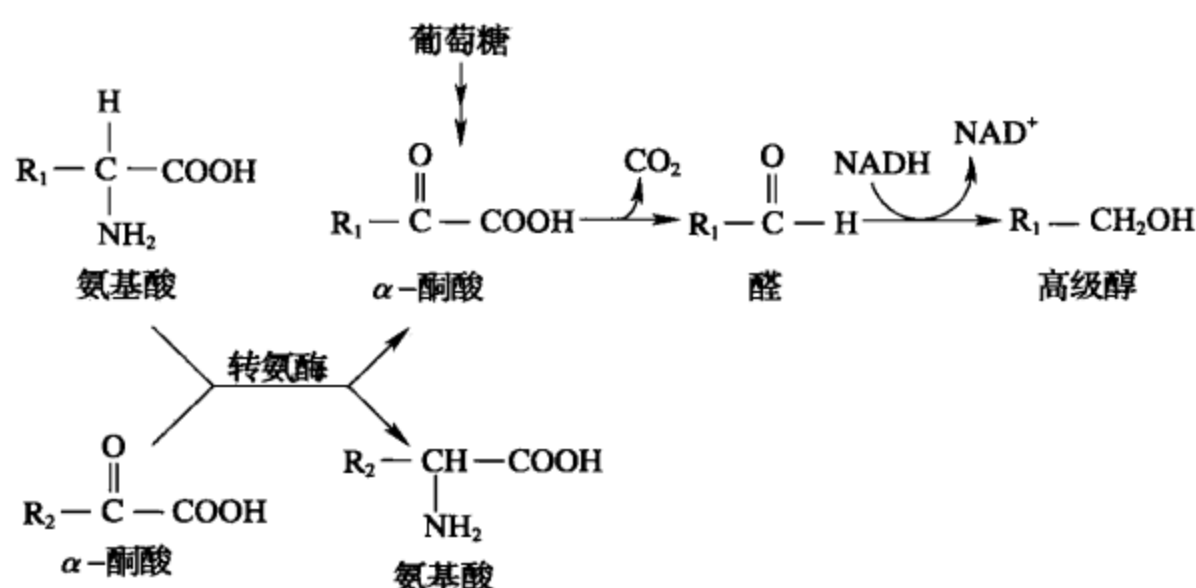


图 1.13 酿酒酵母中高级醇的合成途径

仅靠葡萄汁中可利用的氨基酸,不足以合成葡萄酒中现有浓度的杂醇油。Castor和Guymon(1952)早期的工作表明,杂醇油的产生要多于氨基酸所形成的量。Chen(1978)测定后发现,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸所转化的高级醇只分别占到相应高级醇的30%、34%、75%和80%。事实上,高级醇也能够通过另一条途径生成,也就是葡萄糖利用糖酵解途径转变成丙酮酸,丙酮酸再转化成高级醇(Lambrechts和Pretorius, 2000)。

发酵过程中高级醇的形成受到葡萄醪中总氮含量和氨基酸浓度等多个因素的影响(Bell等, 1979; Ough和Bell, 1980; Webster等, 1993)。通常来说,提高葡萄醪中氮水平,将减少高级醇的形成。其他影响因素包括发酵温度(Crowell和Guymon, 1963)、悬浮或不溶性固形物(Crowell和Guymon, 1963; Klingshirn等, 1987; Edwards等, 1990)、葡萄汁/醪中的溶氧情况(Guymon等, 1961)。

所有的酵母都能代谢合成大量的酯,如乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸异丁酯、丁酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯,以及2-苯乙酸乙酯(Nykäen和Nykäen, 1977; Soles等, 1982; Edwards等, 1990; Webster等, 1993; Rojas等, 2001; 2003; Plata等, 2003; Lee等, 2004)。不同的酰基转移酶和“酯合成酶”催化醇(通常是乙醇)与羧酸反应生成酯(Mason和Dufour,

2000)。影响酯合成的因素包括葡萄的成熟度、糖分含量、发酵温度和葡萄汁澄清度 (Houtman 等, 1980a; 1980b; Edwards 等, 1990)。

如 Lambrechts 和 Pretorius (2000) 和 Verstrepen 等 (2003) 所述, 酯具有不同的气味。如乙酸乙酯具有“类似溶剂”或“指甲油”味, 乙酸异戊酯具有水果香、梨香和香蕉香, 丁酸乙酯具有花香或水果香, 己酸乙酯和辛酸乙酯具有酸苹果味, 苯乙酸乙酯具有花香、玫瑰香或甜味。由于酵母产生的酯浓度各不相同, 这些化合物都必将显著影响葡萄酒的风味 (Schreier, 1979)。

1.5.4 糖苷酶

单萜是葡萄中重要的气味和风味物质 (Rapp 和 Mandery, 1986), 包括香叶醇、橙花醇、里哪醇、香茅醇和 α -松油醇 (见图 1.14)。这些化合物分布在葡萄浆果的不同部位 (Wilson 等, 1986)。虽然单萜类物质能产生植物般的芳香气味, 但在葡萄中多种物质是以糖苷结合态存在, 不具有挥发性 (见图 1.15)。为赋予葡萄酒更多的葡萄风味, 需用特定的酶如糖苷酶, 从萜烯类物质中除去糖分子 (van Rensburg 和 Pretorius, 2000)。事实上, 有些科学家尝试用具有高酶活性的酵母或细菌培养物来释放游离态单萜 (Günata 等, 1986; 1990; McMahon 等, 1999; Cabaroglu 等, 2003)。例如, Delcroix 等 (1994) 将具有更高 β -糖苷酶活性的酿酒酵母菌株应用于葡萄酒的处理, 结果显示, 萜烯类物质的浓度变化很小, 处理后葡萄酒的感官特征未有改变。几年后, Mendes Ferreira 等 (2001)

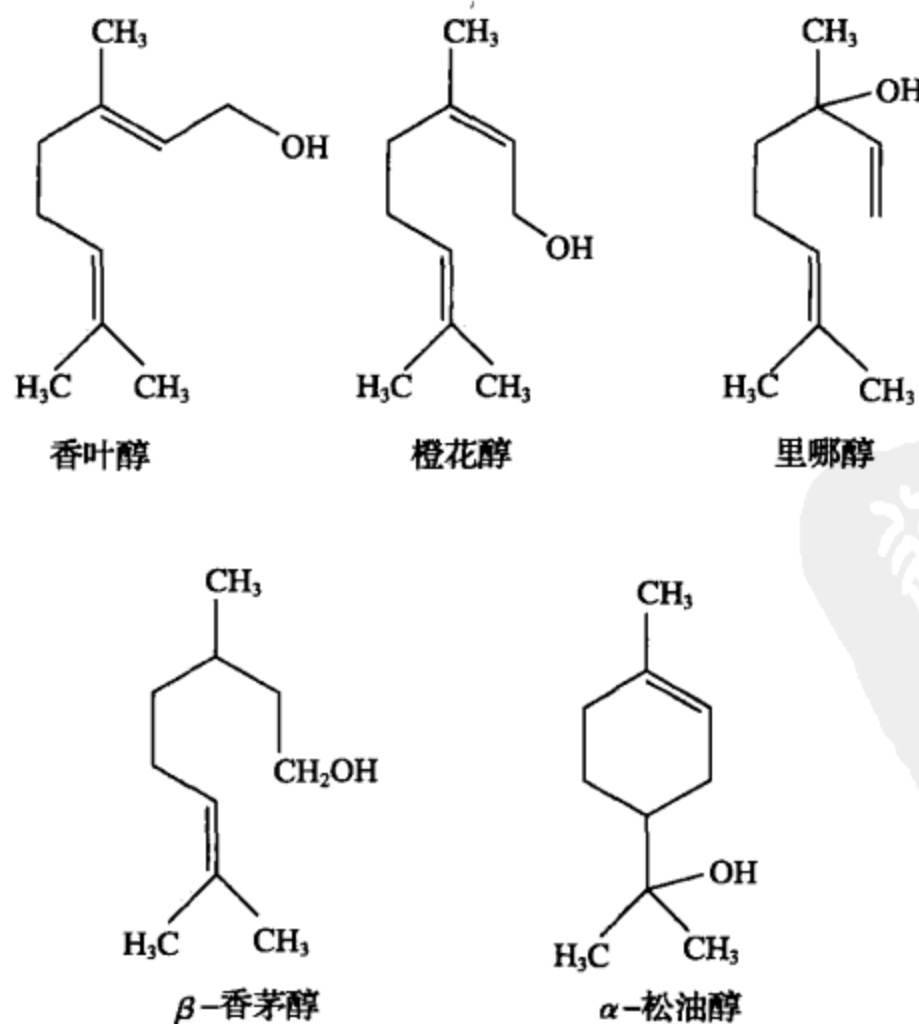


图 1.14 某些酿酒葡萄中存在的单萜类物质

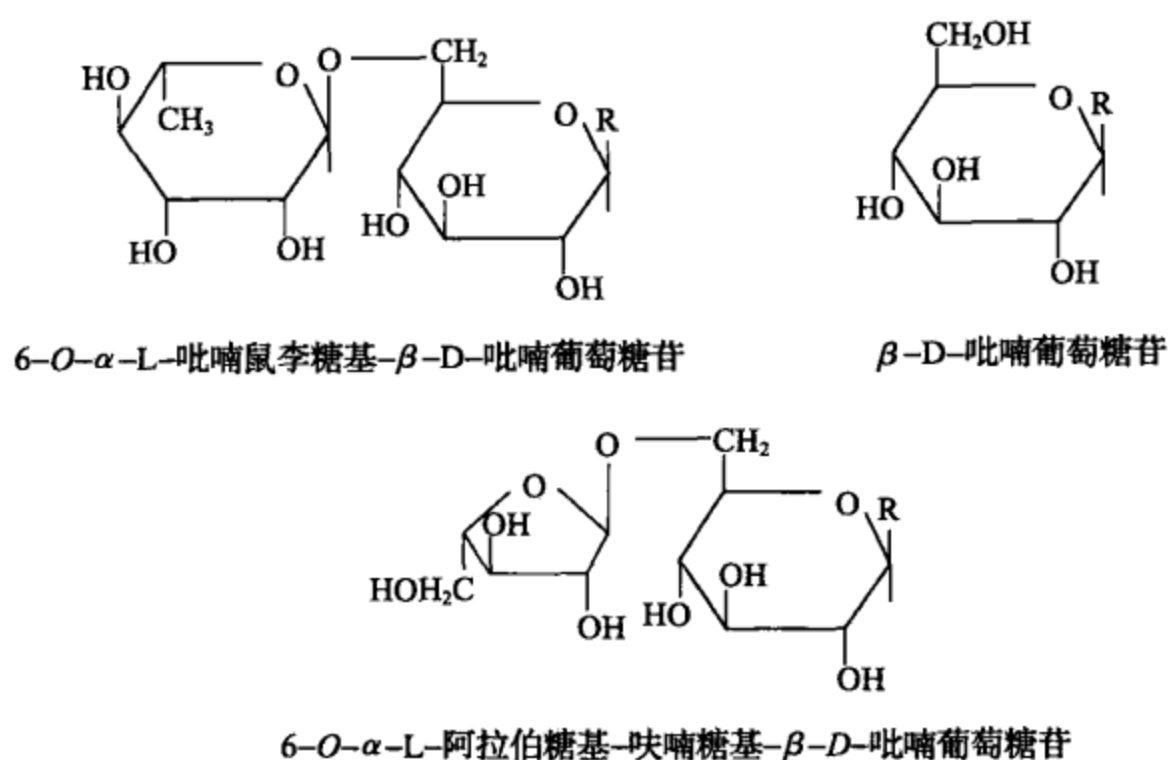


图 1.15 某些酿酒葡萄品种中存在的单萜配糖体 (R 基团代表香叶醇、橙花醇、里哪醇、香茅醇或 α-松油醇)

和 Rodríguez 等 (2004) 都发现,选用的非酿酒酵母菌种 (假丝酵母、克勒克酵母、毕赤酵母和梅奇酵母) 具有高糖苷酶活性,能为葡萄酒提供不同的芳香物质。虽然酒香酵母具有糖苷酶活性, Mansfield 等 (2002) 测定时发现,该酶对从葡萄中分离出的糖苷不具有活性。

用酶代替具有酶活性的微生物添加到葡萄醪中,是提高葡萄酒质量的一种手段。例如, Yanai 和 Sato (1999) 在葡萄酒中添加从汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 中纯化得到的 β-糖苷酶,处理后的葡萄酒中萜类化合物浓度提高,里哪醇和橙花醇的浓度提高更高。Cabaroğlu 等人 (2003) 用真菌来源的糖苷酶处理葡萄酒,增强了蜂蜜香、柠檬味和烟熏味等特性。

1.5.5 甘露糖蛋白质

甘露糖蛋白质是酵母自溶时从细胞壁释放出的一种复杂的胶体物质 (Goncalves 等, 2002; Charpentier 等, 2004)。Feuillat (2003) 研究表明,甘露糖蛋白质是种重要的能提高葡萄酒质量的糖蛋白质,它们能提高蛋白质和酒石酸的稳定性,与芳香化合物相互作用,降低单宁的涩味和苦味,提高葡萄酒酒体的饱满度。例如, Dupin 等 (2000) 报道,甘露糖蛋白质可预防蛋白质浑浊。Lubbers 等 (1994) 研究发现,酵母的细胞壁能结合挥发性芳香化合物,疏水性强的化合物更易结合到细胞壁上。通过这种方式,降低了葡萄酒中相应化合物的浓度,潜在地影响了葡萄酒的感官特征。

虽然甘露糖蛋白质主要是由甘露糖和蛋白质以及一些葡萄糖组成的,但它们是支链较多、分子质量变化较大的一类分子 (Goncalves 等, 2002; Doco 等, 2003)。目前并不清楚每个部分对葡萄酒质量的影响,但特定的加

工处理方式会影响葡萄酒中甘露糖蛋白质的数量。例如，在葡萄酒陈酿过程中搅拌酒脚，可增加芳香化合物的浓度，而微氧作用不明显（Doco 等，2003）。由于甘露糖蛋白质的释放需要较长的时间，Feuillat（2003）建议在生产上选用蛋白质合成能力强、发酵结束迅速自溶的酵母菌株。此外，Feuillat 建议添加酶（如 β -1, 3 葡聚糖酶）使酵母细胞壁释放出更多的甘露糖蛋白质。



第2章 乳酸菌

2.1 引言

乳酸菌包含多个微生物种属,虽然这些微生物在生态学上存在区别,但在糖代谢时都形成了同一种初级代谢产物,即乳酸(Davis等,1985b;1988;Lonvaud-Funel,1999;Carr等,2002;Liu,2002)。乳酸菌通过同型发酵或异型发酵途径(见2.4.1)利用糖以及葡萄醪中主要的酸类物质L-苹果酸(见2.4.3)。有些细菌在特定的葡萄酒中繁殖,有助于提高酒的品质(如苹果酸-乳酸发酵),然而其他种属细菌的生长将导致酒的腐败。

2.2 分类

从葡萄醪或葡萄酒中分离到的乳酸菌属于两个科三个属,即乳杆菌科(Lactobacillaceae)中的乳杆菌属(*Lactobacillus*)和链球菌科(Streptococcaceae)中的酒球菌属(*Oenococcus*)和片球菌属(*Pediococcus*)。

2.2.1 乳杆菌属(*Lactobacillus*)

乳杆菌包括一大类高度多样性的革兰阳性(G^+)、微需氧细菌,显微镜下形态呈短杆状,甚至球杆状(见图2.1)(Kandler和Weiss,1986)。虽然乳杆菌属中有些菌株能利用不含亚铁血红素的假过氧化氢酶分解过氧化氢,但它们是过氧化氢酶阴性(Johnston和Delwiche,1962;Kono和Fridovich,1983;Beyer和Fridovich,1985)。*Lactobacillus* spp. 可同型或异型发酵代谢己糖(见2.4.1)。表2.1列出了葡萄醪或葡萄酒中分离到的乳杆菌属一些菌种鉴定时相关的生理特性指标。

从全世界的葡萄醪和葡萄酒中分离到的乳杆菌属的菌种包括短乳杆菌(*L. brevis*)、布氏乳杆菌(*L. buchneri*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)、纤维二糖乳杆菌(*L. cellobiosus*)、弯曲乳杆菌(*L. curvatus*)、德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)、*L. diolivorans*、食果糖乳杆菌(*L. fructivorans*)、*L. heterohiochii*、希氏乳杆菌(*L. hilgardii*)、詹氏乳杆菌(*L. jensenii*)、*L. kunkeei*、莱希曼乳杆菌

(*L. leichmanni*)、*L. nagelli*、*L. paracasei*、植物乳杆菌 (*L. plantarum*)、发状乳杆菌 (*L. trichodes*)、*L. vermiforme* 和山梨乳杆菌 (*L. yamanashiensis*) (Douglas 和 Cruess, 1936; Vaughn, 1955; Fornachon, 1957; Kitahara 等, 1957, Du Plessis 和 van Zyl, 1963a; Pilone 等, 1966; Carr 等, 1977; Chalfan 等, 1977; Maret 和 Sozzi, 1977; 1979; Costello 等, 1983, Lafon – Lafourcade 等, 1983b; Nonomura, 1983; Davis 等, 1986a; 1986b; Dicks 和 van Vuuren, 1988; Sieiro 等, 1990; Edwards 等 1993; 1998a; 2000; Mills, 2001; Gorga 等, 2002; Beneduce 等, 2004; Du Plessis 等, 2004)。

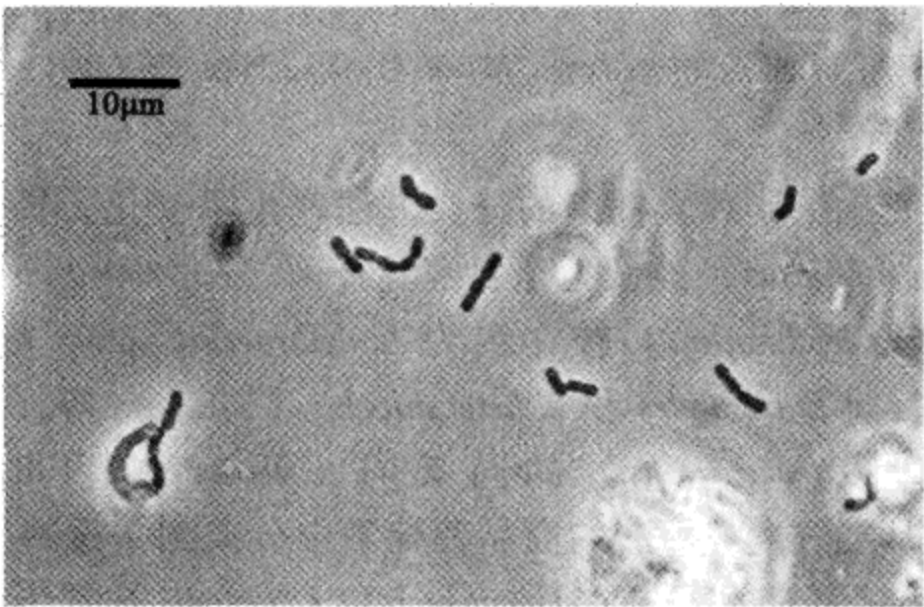


图 2.1 相差显微镜观察短乳杆菌 (*L. brevis*)
(放大倍数: 1000 ×, 照片由 WineBugs LLC 提供)

表 2.1 葡萄酒中分离到的几种乳杆菌的特性

特性	短乳杆菌 (<i>L. brevis</i>)	希氏乳杆菌 (<i>L. hilgardi</i>)	<i>L. kunkeei</i>	植物乳杆菌 (<i>L. plantaru</i>)
精氨酸氧化能力	+	+	-	-
接触酶	v	+	w	v
葡萄糖产气	+	+	+	-
七叶苷水解能力	v	-	-	+
葡萄糖代谢产生乳酸	DL	DL	L	DL
果糖代谢产生甘露醇	+	+	+	-
发酵能力:				
阿拉伯糖	+	-	-	v
果糖	+	+	+	+
乳糖	v	v	-	+
甘露醇	-	-	+	+

续表

特性	短乳杆菌 (<i>L. brevis</i>)	希氏乳杆菌 (<i>L. hilgardi</i>)	<i>L. kunkeei</i>	植物乳杆菌 (<i>L. plantaru</i>)
麦芽糖	+	+	-	+
松三糖	-	v	-	+
核糖	+	+	-	+
蔗糖	v	v	+	+
海藻糖	-	-	-	+
木糖	v	+	-	v

注：(+) ≥90% 的菌株是阳性；(-) ≥90% 的菌株是阴性；(v) 菌株的反应可变；(w) 弱反应。
摘自 Kandler 和 Weiss (1986), Dicks 和 van Vuuren (1988), Pilone 等 (1991), Hammes 等 (1992), 和 Edwards 等 (1993; 1998)。

近年来的研究成果导致乳杆菌的分类方法产生了变化。具体体现，如纤维二糖乳杆菌 (*L. cellobiosus*) 被认为是发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) 的同义词，而莱希曼乳杆菌 (*L. leichmanni*) 被命名为 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Kandler 和 Weiss, 1986)。目前 *L. trichodes* 和 *L. heterohiochii* (Kitahara 等, 1957) 也被视为食果糖乳杆菌 (*L. fructivorans*) 的同义词 (Weiss 等, 1983)。Edwards 等 (1998a; 2000) 从经过发酵停滞的商品葡萄酒中分离到 2 株特别的 *Lactobacillus* spp.。根据表型和系统进化分析，*L. kunkeei* 和 *L. nagelii* 被认为是新的菌种。关于 *L. vermiforme* 的描述很少 (Sharpe 等, 1972; Garvie, 1976)，无法确认 *L. vermiforme* 代表一个独立的菌种，还仅仅是同源性很高的菌种希氏乳杆菌 (*L. hilgardi*) 的同义词。

2.2.2 酒球菌属 (*Oenococcus*)

过去被鉴定为 *Leuconostoc gracile*、噬柠檬酸明串珠菌 (*Leuconostoc citrovorum*) 和酒明串珠菌 (*Leuconostoc oenos*) 的葡萄酒细菌，现被重新归类于酒球菌属 (Pilone 和 Kunkee, 1965; Garvie, 1967a; Kunkee, 1967a)。随后系统进化分析揭示酒明串珠菌 (*L. oenos*) 与明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 其他种差异大 (Martinez - Murcia 等, 1993)，导致酒明串珠菌 (*L. oenos*) 被归类为一个新的属，即酒球菌属 (Dicks 等, 1995)。考虑到其生理特性的多样性，如糖类发酵模式，Tracey 和 Britz (1987) 提议，酒酒球菌 (*O. oeni*) 可能不仅仅只包含一种微生物。

酒酒球菌 (*O. oeni*) 的菌株被描述为革兰阳性菌，不能移动，兼性厌氧，过氧化氢酶阴性，成对或成链，显微镜下为椭圆体或球形 (见图 2.2) (Garvie, 1967a; 1986a; Holzapfel 和 Schillinger, 1992; Dicks 等, 1995)。在显微镜下，酒酒球菌与短杆状的乳杆菌难以区分 (见图 2.1)。酒酒球菌是异型发酵乳酸菌，把葡萄糖转化成等分子的 D - 乳酸、CO₂、乙醇或乙酸等初级代谢产物 (Krieger 等, 1993; Cogan and Jordan, 1994; Coccagn - Bousquet 等, 1996)。酒酒球菌能

代谢葡萄糖产生气体，水解七叶苷，利用葡萄糖形成D-乳酸，分解果糖形成甘露醇，消耗精氨酸形成氨（Pilone 等，1991；Holzapfel 和 Schillinger，1992；Dicks 等，1995）。

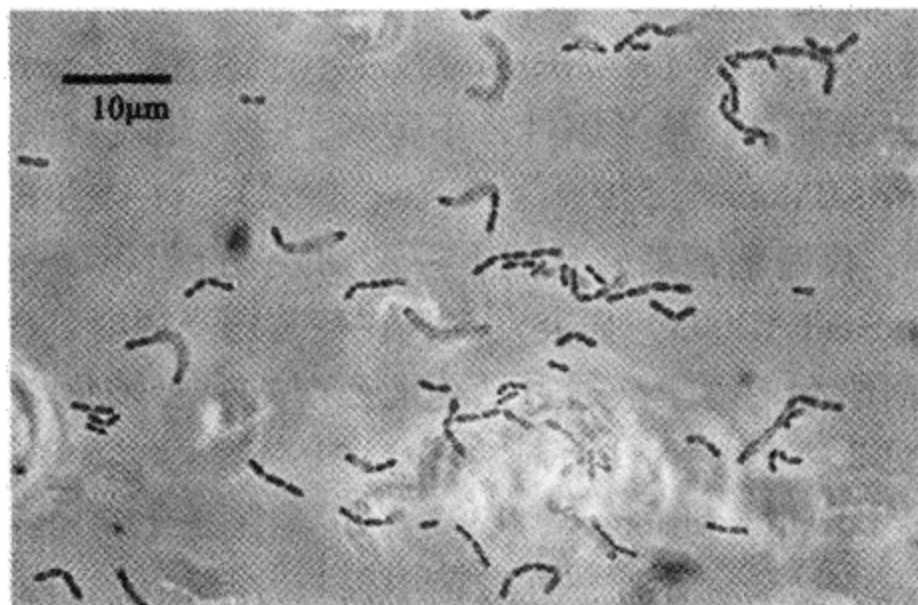


图 2.2 相差显微镜观察酒酒球菌（放大倍数：1000 ×，照片由 WineBugs LLC 提供）

虽然酒酒球菌是该属唯一的一个种，但由于发酵特定碳水化合物时具有广泛的可变性，酒酒球菌被归类为异型发酵微生物（Lafon - Lafourcade 等，1983b；Tracey 和 Britz，1987；Davis 等，1988；Kelly 等，1989；Edwards 等，1991）。酒酒球菌的绝大多数菌株能利用L-阿拉伯糖、果糖和核糖，但不能利用半乳糖、乳糖、麦芽糖、松三糖、棉籽糖或木糖。Lafon - Lafourcade 等（1983b）注意到，所分析的菌株中仅有11%能同时利用果糖和葡萄糖，与其他研究结果相反（Pilone 和 Kunkee，1972；Beelman 等，1977；Izugabe 等，1985；Edwards 等，1991）。Davis 等（1988）检测发现，所研究的菌株中有55%能发酵核糖，27%能发酵D-阿拉伯糖。Chalfan 等（1977）所分析的A-9菌株能发酵葡萄糖，但不能发酵果糖。虽然菌株特性是引起碳水化合物发酵能力差异的原因之一，但测定方法、球菌苛刻的生长特性所限定的培养基组成（Garvie，1967a；1967b）的差异也可能导致研究结果的不同。

通过苹果酸-乳酸发酵（MLF），酒酒球菌能代谢葡萄中的苹果酸生成乳酸（见2.4.3和6.4.2）。虽然经过分析，乳酸菌的其他菌种也可被用作苹果酸-乳酸发酵的生产起始菌种，但酒酒球菌具有优良的生理特性，能持续耐受葡萄酒中的环境，获得理想的效果，长期以来一直受到酿酒师的欢迎。

2.2.3 片球菌属（*Pediococcus*）

在已确认的片球菌属的菌种中（Garvie，1986b；Weiss，1992），仅有四种是从葡萄酒中分离到的，分别是有害片球菌（*P. damnosus*）、小片球菌（*P. parvulus*）、意外片球菌（*P. inopinatus*）和戊糖片球菌（*P. pentosaceus*）（Davis 等，1986a；1986b；Edwards 和 Jensen，1992）。早期多项研究中皆报道，从

葡萄酒中分离到了啤酒片球菌 (*P. cerevisiae*) (Maret 和 Sozzi, 1977; 1979; Costello 等, 1983; Lafon - Lafourcade 等, 1983b; Fleet 等, 1984)。有些菌种如有害片球菌 (*P. damnosus*) 和戊糖片球菌 (*P. pentosaceus*)，早期的分类是错误的，它们至少代表了两种微生物 (Garvie, 1974; Raccach, 1987)。在葡萄酒中分离到的片球菌中，有害片球菌 (*P. damnosus*) 和小片球菌 (*P. parvulus*) 更常见。

片球菌的生理特征是：革兰阳性，不运动，过氧化氢酶阴性，好氧或微好氧 (Garvie, 1986b; Pilone 等, 1991; Weiss, 1992)。该属的微生物是同型发酵类型 (见 2.4.1)，代谢葡萄糖转化成 L - 或 DL - 乳酸 (Garvie, 1986b)。Pasteris 和 Strasser de Saad (2005) 研究发现，在葡萄糖受限时，*P. pentosaceus* 菌株降解丙三醇生成丙酮酸，丙酮酸通过活化的乙醛进一步转化成乙酸、双乙酰或 2, 3 - 丁二醇 (见 2.4.5)。片球菌通常具有将 L - 苹果酸转化成 L - 乳酸的能力 (Raccach, 1987; Edwards 和 Jensen, 1992)。片球菌是化能异养生物，对于生长因子和氨基酸的需求复杂。此外，乳酸菌中仅有片球菌能在两个平面上进行分裂，形成成对、四联体或成块的球状细胞 (见图 2.3) (Garvie, 1986b; Axelson, 1998)。片球菌属的三种微生物的特性列于表 2.2 中。

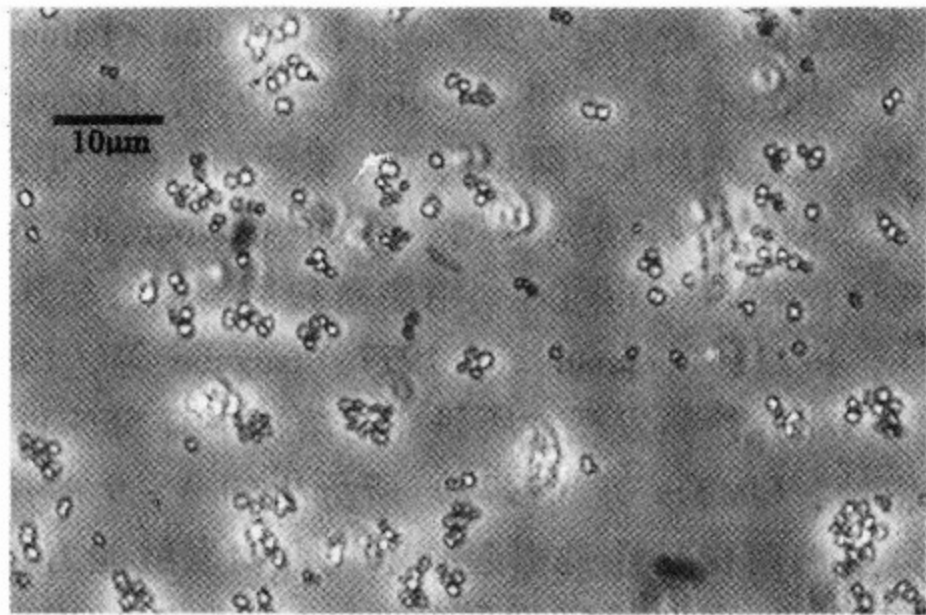


图 2.3 相差显微镜观察有害片球菌 (放大倍数: 1000 × , 照片由 WineBugs LLC 提供)

表 2.2		片球菌的特性		
特性	有害片球菌	小片球菌	戊糖片球菌	
精氨酸氧化能力	-	-	+	
接触酶	-	-	v	
葡萄糖产气	-	-	-	
七叶苷水解能力	+	+	+	
葡萄糖代谢产生乳酸	DL	DL	DL	
果糖代谢产生甘露醇	-	-	-	
发酵能力:				
阿拉伯糖	-	-	+	

续表

特性	有害片球菌	小片球菌	戊糖片球菌
果糖	+	+	+
乳糖	-	-	v
甘露醇	-	-	-
麦芽糖	v	+	+
松三糖	v	-	-
核糖	-	-	+
蔗糖	v	-	-
海藻糖	+	v	+
木糖	-	-	v

注：(+) ≥90% 的菌株是阳性；(-) ≥90% 的菌株是阴性；(v) 菌株的反应可变。
摘自 Garvie (1986b), Pilone 等 (1991) 和 Weiss (1992)。

2.3 营养需求

乳酸菌自身进行生物合成的能力非常有限，所以增殖所需的外界营养条件比较苛刻。Du Plessis (1963) 的早期研究中发现，葡萄酒中所有乳酸菌必需的生长因子包括烟酸、核黄素、泛酸、维生素 B₁ 或维生素 B₆。二十多年后，Garvie (1986b) 报道，片球菌属的所有菌种生长必需烟酸、泛酸和维生素 H，都不需要维生素 B₁、p-对氨基苯甲酸或维生素 B₁₂。多种氨基酸如谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸，对于乳酸菌的生长也是必需的。Garvie (1967b) 获得了相似的结果，但球菌属（明串珠菌属）的不同菌株可能对半胱氨酸、酪氨酸以及其他化合物具有不同的依赖性。此外，许多菌种也需要嘌呤类化合物（鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤和尿嘧啶）和叶酸。最后，必须注意的是乳酸菌不能利用磷酸氢二氨作为氮源，必需依赖氨基酸。

另一种重要的营养物质被称为番茄汁因子（Garvie 和 Mabbitt, 1967）。因为很多从葡萄醪或葡萄酒中分离到的乳酸菌，在添加了水果或蔬菜浆汁的培养基（如番茄或苹果）中生长状况更佳，所以称其为番茄汁因子（见 13.6）。不同的生长阶段和菌株，具体需求有所区别（Garvie, 1984）。事实上，Tracey 和 Britz (1987) 发现，酒球菌的菌株在不添加番茄汁因子的培养基中也能生长，但生长速度较慢。Amachi (1975) 确定番茄汁因子的成分是种泛酸衍生物，即 4-O-(α-D-吡喃葡萄糖基)-D-泛酸。

2.4 新陈代谢

2.4.1 葡萄糖

完成乙醇发酵后，葡萄酒中残留低浓度的己糖，包括葡萄糖和果糖，以及

更少的甘露糖和半乳糖。在五碳糖（戊糖）中常见的是阿拉伯糖、核糖和木糖。在干型葡萄酒中可能存在足够的糖类物质，维持乳酸菌的生长。

乳酸菌利用糖类物质（如葡萄糖），通过同型或异型发酵途径形成乳酸。如图 2.4 所示的同型发酵途径，通过 EMP 途径（糖酵解途径），可将葡萄糖转化成丙酮酸，最终形成乳酸。3-磷酸甘油醛氧化成 1,3-二磷酸甘油酸时，还原 NAD^+ 释放 NADH 。乳酸脱氢酶（LDH）还原丙酮酸盐至乳酸盐时，又将 NADH 氧化成 NAD^+ 。不同来源的 LDH，其立体选择性不同，产生的可能是 D-乳酸或 L-乳酸，或外消旋产物（DL）。虽然 1mol 的葡萄糖应当产生 2mol 乳酸，但乳酸的实际产量接近 1.8mol（Gottshalk, 1986）。从产生的能量计算，糖酵解分解 1mol 葡萄糖，释放 2mol ATP。这些微生物中存在 EMP 途径中的关键酶醛缩酶，催化 1mol 1,6-二磷酸果糖转变成 2mol 3-磷酸甘油醛（见图 2.4）。与酿酒酵母相同，这些细菌不能代谢戊糖。乳杆菌中德氏乳杆菌（*L. delbrueckii*）和詹氏乳杆菌（*L. jensenii*）进行同型发酵。

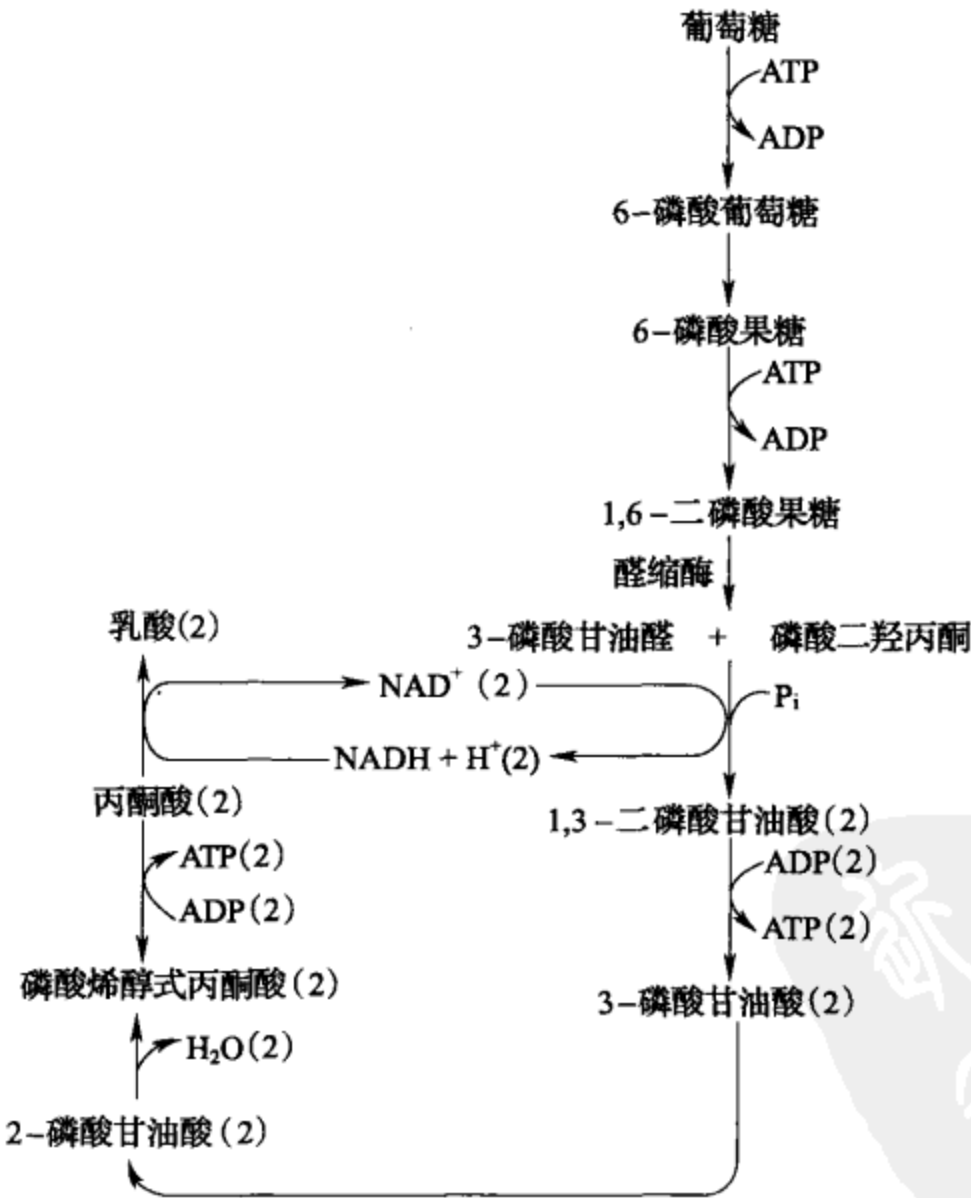


图 2.4 形成乳酸的同型发酵途径

异型发酵菌种（如酒酒球菌、短乳杆菌、希氏乳杆菌、食果糖乳杆菌和 *L. kunkeei*）缺乏醛缩酶，通过一系列反应如戊糖磷酸途径或磷酸木酮糖途径，改变碳的流向（见图 2.5）。从 1mol 葡萄糖出发，异型发酵细菌产生 1mol 的乳

酸盐、CO₂、乙酸或乙醇。实际上，这些细菌仅能产生 0.8mol 乳酸（Gottshalk, 1986）。与同型发酵微生物不同，这些细菌不具有醛缩酶活性，但存在磷酸解酮酶活性，该酶能裂解 5-磷酸木酮糖生成 3-磷酸甘油醛和乙酰磷酸。由于此途径中生物合成五碳糖（5-磷酸核酮糖和 5-磷酸木酮糖），因此一些菌株能利用葡萄酒中的戊糖，如核糖、木糖和阿拉伯糖。葡萄糖中仅有一半碳原子转变成 3-磷酸甘油醛，导致发酵 1mol 葡萄糖仅产生 1mol ATP。然而，异型发酵细菌可通过乙酰磷酸转化成乙酸获得额外的能量（见图 2.5）。

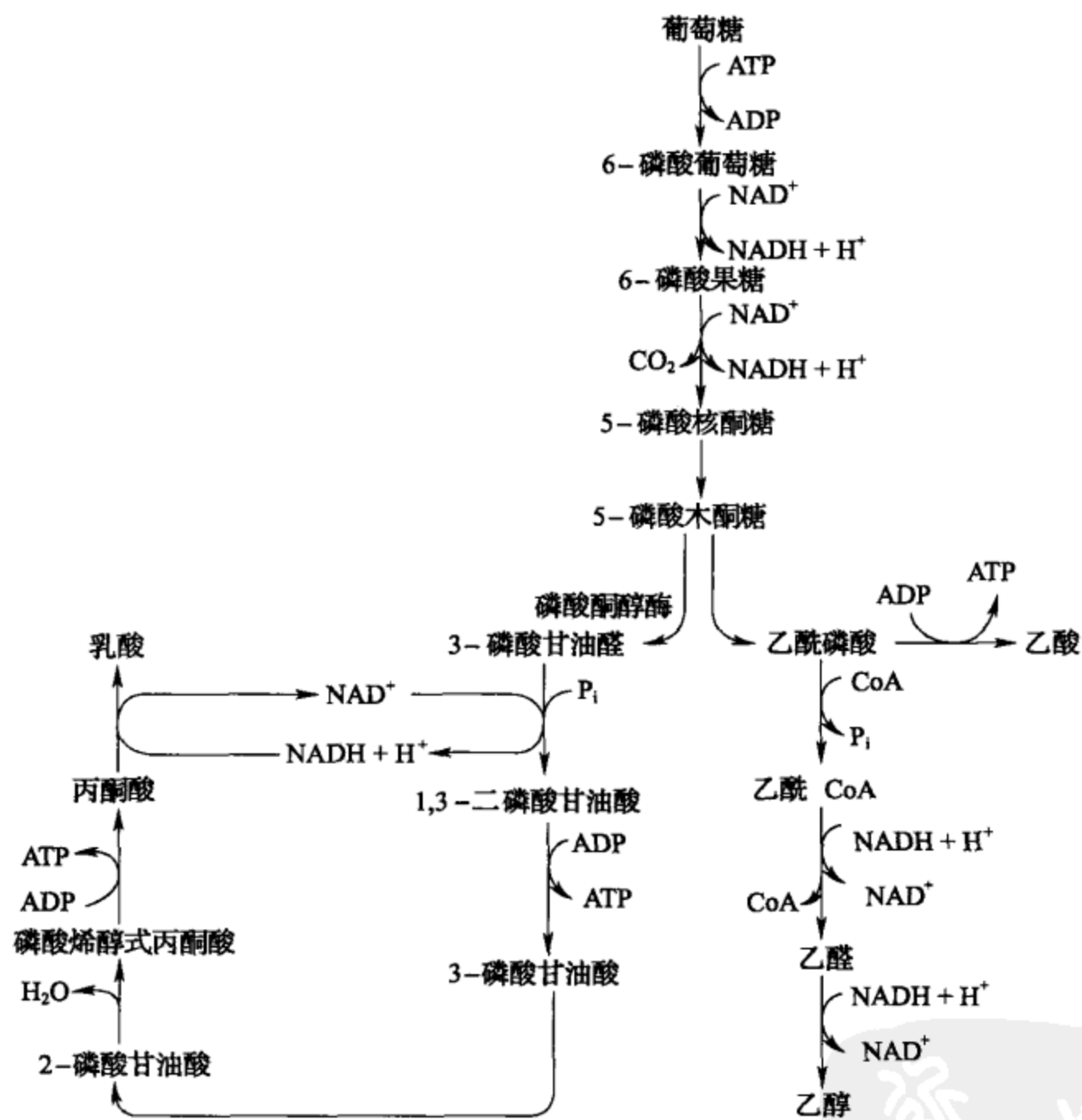


图 2.5 异型发酵途径产生乳酸、CO₂、乙醇或乙酸

从酿酒师的角度看，图 2.5 强调了成功利用这些微生物的重要性，尤其是在微氧条件下己糖和戊糖可转变成乳酸。在还原条件下，细胞中缺乏 NAD⁺，乙酰磷酸被转变成乙醇而不是乙酸。在氧化条件下，乙酰磷酸转变成乙酸，释放 ATP，提高了挥发酸含量（见 11.3.1）。

除了同型和异型发酵细菌，Kandler 和 Weiss（1986）描述了第三类细菌，即兼性发酵细菌。虽然这些细菌可通过同型发酵途径利用己糖（见图 2.4），但当戊糖作为诱导物时，它们也具有磷酸激酶活性（见图 2.5），葡萄酒细菌中属

于兼性发酵的有干酪乳杆菌 (*L. casei*) 和植物乳杆菌 (*L. plantarum*)。

2.4.2 精氨酸

许多异型发酵乳酸菌具有利用精氨酸合成鸟氨酸、 NH_3 、 CO_2 和 ATP，并释放能量的能力 (见图 2.6)。乳酸菌分解精氨酸产生氨的能力，可用章节 15.4.1 叙述的方法进行测定。

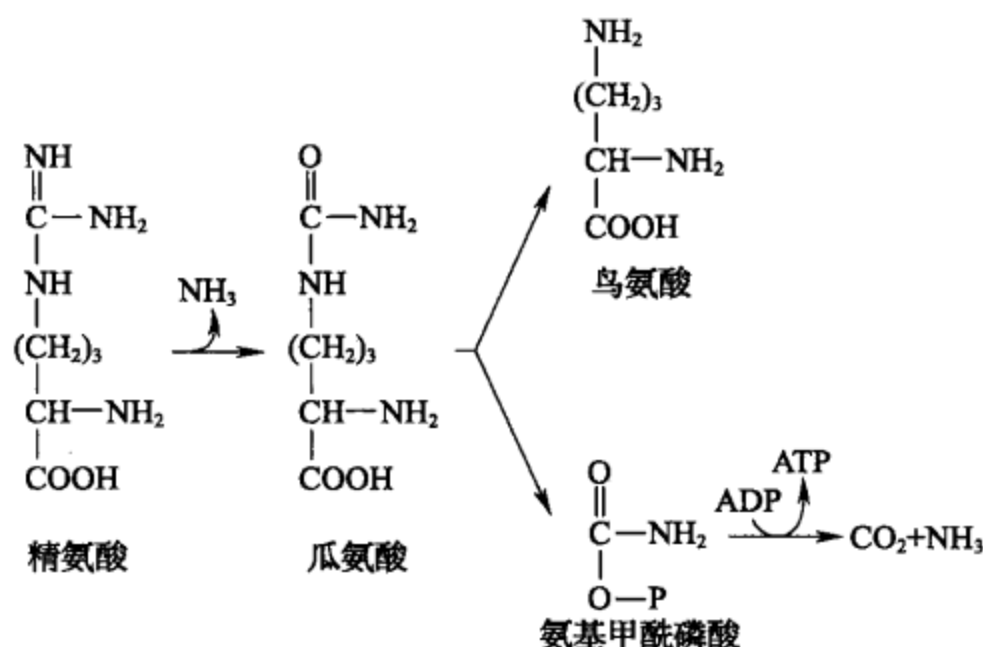


图 2.6 一些异型发酵乳酸菌分解精氨酸形成鸟氨酸、氨和 CO_2

目前的观点认为，绝大多数异型发酵乳杆菌能代谢精氨酸产生 NH_3 ，而同型发酵乳杆菌和酒酒球菌无此能力 (Garvie, 1967a; Kandler 和 Weiss, 1986; Tonon 和 Lonvaud - Funel, 2002)。然而，Pilone 等人 (1991) 怀疑，低浓度氨测定方法中通用的奈斯勒试剂灵敏度过低，并认为一些异型发酵乳杆菌仅参与最初的两步生化反应，每摩尔精氨酸只能产生 1mol NH_3 (见图 2.6)。由于上述这些问题，作者建议，氨基酸浓度从 0.3g/L 提高到 0.6g/L。Pilone 等人 (1991) 发现，提高 L-精氨酸浓度后，事实上有些酒酒球菌的菌株能产生氨。除了精氨酸浓度等问题外，Liu 等人 (1995b) 注意到，果糖能抑制一些菌株分解精氨酸的能力。

2.4.3 苹果酸

虽然苹果酸可促进酒酒球菌的生长 (Firme 等, 1994)，但苹果酸-乳酸发酵对细菌的生物学效应并不清楚，因为无法测定 ATP 或其他能量的形成 (Pilone 和 Kunkee, 1972)。因而研究者猜测，苹果酸-乳酸发酵具有与能量产生无关的功能 (Kunkee, 1967b; Pilone 和 Kunkee, 1972)。然而，已有研究结果证实，根据化学渗透假说，不同的微生物在细胞膜两侧存在 pH 梯度，利用 pH 梯度可形成 ATP。所以苹果酸-乳酸发酵可通过间接方式产生能量 (Gottschalk, 1986)。在正常条件下，细胞外 H^+ 浓度高于细胞内。利用 ATPase (膜耦联的酶

复合物), 质子 (H^+) 顺着浓度梯度从胞外进入胞内时, 合成 ATP。这个模型要求细胞膜上除了 ATPase 复合物所在的位点允许质粒跨膜通过, 其他部位对质子是不能渗透的。

Cox 和 Henick - Kling (1989; 1995) 证明, 苹果酸 - 乳酸发酵能够产生 ATP, 并认为当细胞向胞外释放乳酸盐和质子时, 理论上会在细胞膜两侧产生质子动力势, 质子动力势又可驱动 ATPase 产生 ATP。该模型也做了相应的修正 (Poolman 等, 1991; Salema 等, 1994), 如图 2.7 所示, L - 苹果酸以单阴离子状态进入细胞内 (低 pH 下主要的状态)。这导致细胞内负电荷增加, 形成电势。随后消耗一个质子, L - 苹果酸被脱羧形成 L - 乳酸和 CO_2 。细胞质中质子的消耗产生 pH 梯度, pH 梯度与电势共同推动膜耦联 ATPase 合成 ATP。Salema 等 (1994; 1996) 认为, L - 乳酸和 CO_2 是以中性分子形式而不是激活的形式转运到细胞外的。

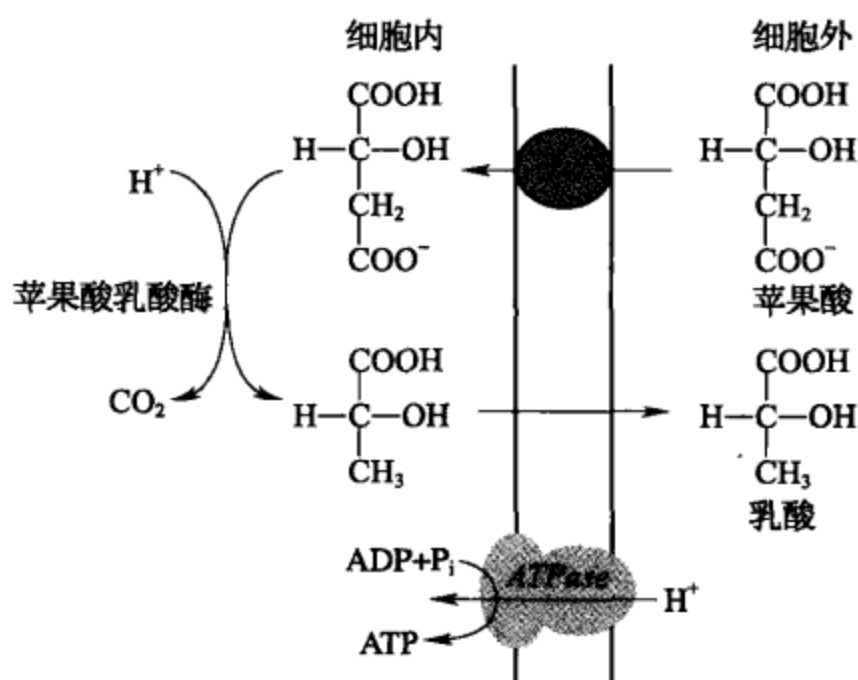


图 2.7 酒酒球菌通过苹果酸转化成乳酸和 CO_2 生成 ATP 的模型

Poolman 等 (1991) 对该模型进行了修改

2.4.4 甘露醇和赤藻糖醇

如前所述, 许多异型发酵乳酸菌通过乙酰磷酸转化成乙酸而不是乙醇, 从而获得额外的能量。虽然生成了额外的 ATP, 但细胞内将利用另一个电子受体果糖来再生 NAD^+ (Wisselink 等, 2002)。乳酸菌细胞中甘露醇脱羧酶还原果糖生成甘露醇的过程如图 2.8 所示。

在实验室分析中, 利用甘露醇的生成来区别异型发酵细菌和同型发酵细菌 (见 15.4.10)。虽然这是异型发酵乳酸菌的基本特性之一, 但有些同型发酵菌株也能产生少量的糖醇 (Wisselink 等, 2002)。

Veiga - da - Cunha 等 (1993) 观察到, 在厌氧条件下酒酒球菌代谢葡萄糖而不代谢果糖和核糖, 将产生另一种糖醇——赤藻糖醇。氧存在时, 不能合成

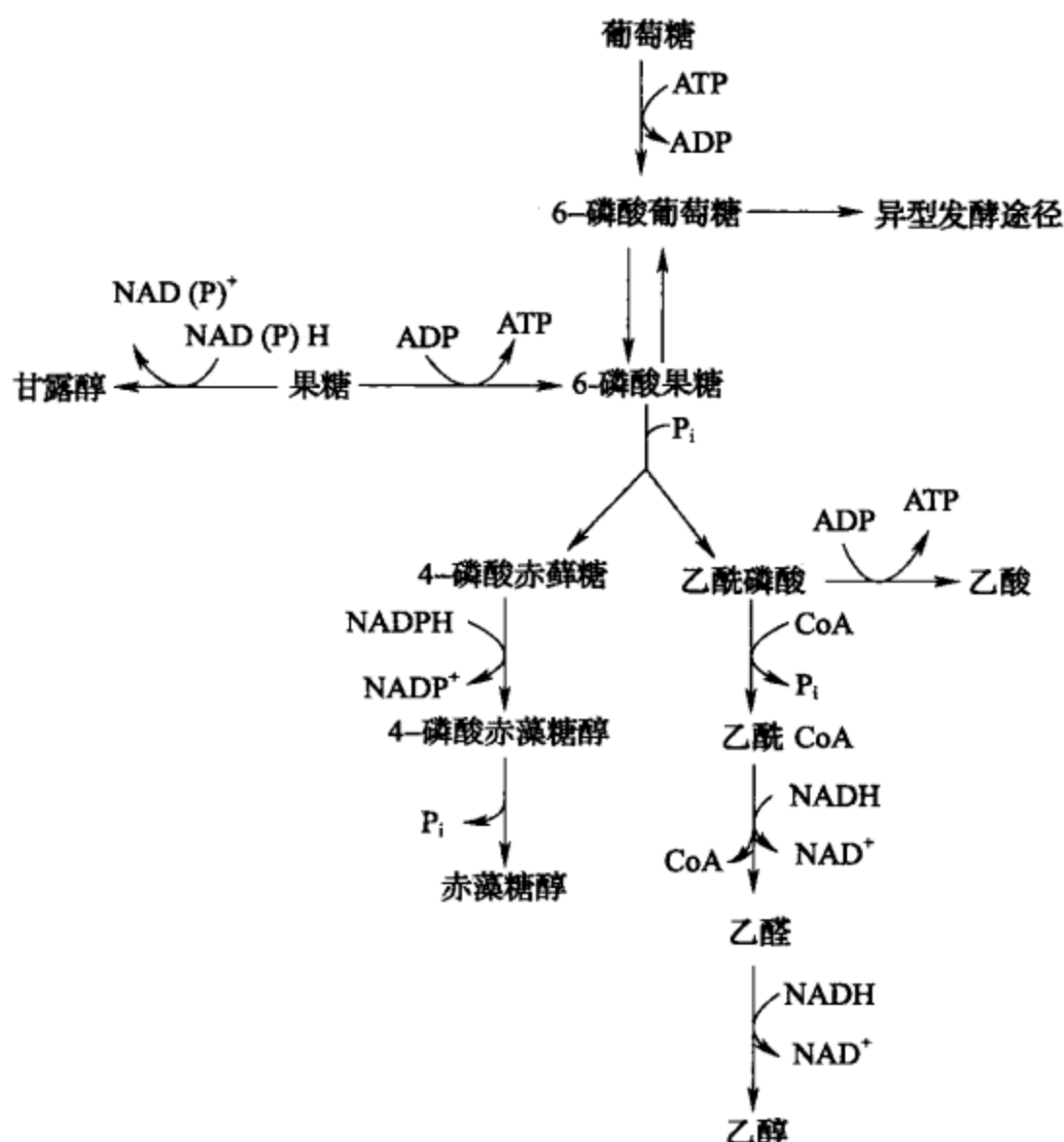


图 2.8 甘露醇和赤藓糖醇的形成途径 (摘自 Veiga - da - Cunha 等, 1993)

赤藓糖醇。Firme 等 (1994) 发现, 在 N_2 或 CO_2 的环境中, 酒酒球菌也会合成赤藓糖醇, 实验结果验证了上述结论。与甘露醇相比, 赤藓糖醇的合成可能与厌氧条件下细胞中 NADPH 的氧化再生有关。

2.4.5 双乙酰和其他风味化合物

2, 3 - 丁二酮, 又称双乙酰, 是乳酸菌产生的一种重要的风味活性物质 (Fornachon 和 Lloyd, 1965; Collins, 1972; El - Gendy 等, 1983; Rodriguez 等, 1990; Martineau 和 Henick - Kling, 1995a; 1995b; Nielsen 和 Richelieu, 1999; Bartowsky 和 Henschke, 2004a; 2004b)。双乙酰具有独特的“奶油”香味, 它的感官阈值有所变化, 在夏敦埃酒中仅为 0.2mg/L, 而在赤霞珠葡萄酒中达到 2.8mg/L (Martineau 等, 1995)。在感官上, 低浓度的双乙酰 (1 ~ 3mg/L) 被描述为奶油味或坚果味, 当浓度超过 5 ~ 7mg/L 时, 其香气表现非常突出, 甚至有不利的影响 (Rankine 等, 1969)。由于受到介质和其他因素的影响, 无法直接根据双乙酰的浓度, 来判断奶油味的感官效应 (Bartowsky 等, 2002)。

不仅可通过糖代谢的同型乳酸或异型乳酸途径合成双乙酰, 菌体细胞中柠檬酸的代谢也可形成双乙酰 (见图 2.9)。柠檬酸先转化成乙酸和草酰乙酸, 草酰乙酸再脱羧形成丙酮酸。虽然早期的研究者认为, 乳酸菌合成双乙酰并不通

过 α -乙酰乳酸 (Gottschalk, 1986), 但近来研究结果说明, 在乳酸菌中这条途径是存在的 (Ramos 等, 1995)。丙酮酸继续脱羧, 并与硫胺素焦磷酸 (TPP) 发生缩合反应, 产生乙醛。乙醛-TPP 与另一分子的丙酮酸反应, 形成 α -乙酰乳酸; α -乙酰乳酸经过氧化脱羧, 形成双乙酰 (Ramos 等, 1995; Bartowsky 和 Henschke, 2004b)。双乙酰进一步转化成乙偶姻和 2,3-丁二醇。有研究者提出, 乙醛可能与乙酰-CoA 通过另一条途径发生反应, 但至今没有分离到该反应中重要的双乙酰合成酶 (Ribéreau-Gayon 等, 2000)。

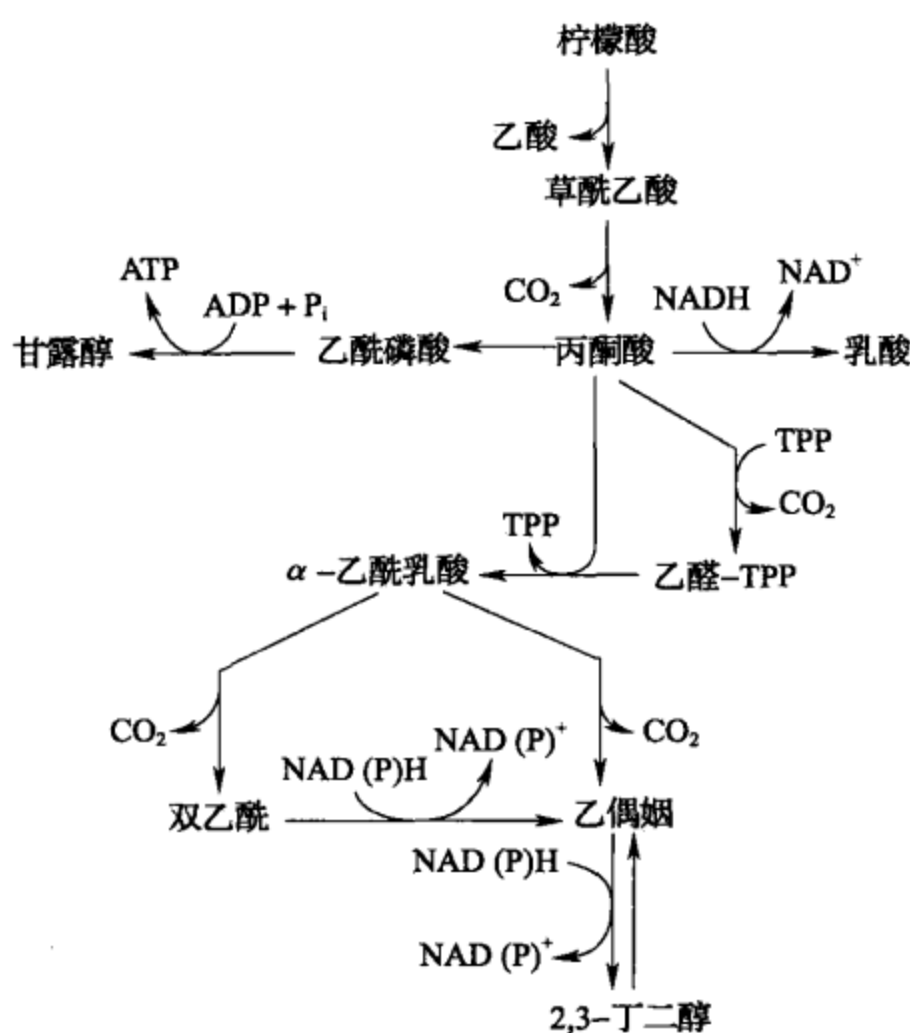


图 2.9 乳酸菌合成双乙酰、乙偶姻和 2,3-丁二醇的生化途径

[摘自 Ramos 等 (1995), Bartowsky 和 Henschke (2004b),
Ribereau-Gayon 等 (2000)] TPP: 硫胺素焦磷酸

在乳杆菌的增殖过程中, 同时伴随着利用苹果酸和柠檬酸, 其中柠檬酸的利用速率较慢 (Pimentel 等, 1994)。因此, 完成苹果酸-乳酸发酵, 并不要求柠檬酸被完全转化, 而且经过苹果酸-乳酸发酵处理的葡萄酒中残留一定浓度的柠檬酸, 有助于刺激细菌合成双乙酰和乙酸。

微生物合成双乙酰是一个动力学过程, 葡萄酒中双乙酰的浓度取决于很多因素, 如发酵所用的菌株、葡萄酒的品种和氧化还原电位 (Martineau 和 Henick-Kling, 1995a; 1995b; Nielsen 和 Richelieu, 1999)。例如, 在酒精发酵过程或刚结束时的苹果酸-乳酸发酵中, 大量存在的酵母快速还原双乙酰生成乙偶姻和丁二醇, 导致最终残留的双乙酰浓度较低。但当酵母数量很少时, 进行苹果酸-乳酸发酵, 发酵液中将形成高浓度的双乙酰。一般来说, 酒酒球菌

生成双乙酰的能力较弱，而乳杆菌或片球菌能合成较高浓度的双乙酰，具有令人厌恶的气味。Prahl 和 Nielsen（1995）研究发现，双乙酰与 SO₂ 的可逆反应能将双乙酰的浓度从 60% 快速降低至 30%。因为该反应是暂时性的，经过数周储存，双乙酰又将恢复到原来的浓度。乳酸菌中影响双乙酰合成的因素总结于表 2.3。

表 2.3 乳酸菌合成双乙酰的影响因素

因素	影响效果
细菌	不同的属、种、株存在差异
接种量	较低的起始接种量 (10 ⁴ ~ 10 ⁶ CFU/mL) 有利于合成反应
葡萄酒与酵母残渣的相互作用 (带酒脚陈酿)	促进合成 (Boulton 等, 1996) 和促进降解 (Bartowsky 和 Henschke, 2004a) 的矛盾结论均有报道
葡萄酒与空气的相互作用	促进 α-乙酰乳酸转化成双乙酰的非酶促反应
添加 SO ₂	与双乙酰结合转变成不具有感官效应的化合物; 抑制细菌生长
添加柠檬酸	有利于双乙酰的合成 (也提高了柠檬酸的含量)
温度	与 25℃ 相比, 18℃ 进行 MLF, 葡萄酒中残留更多的双乙酰
pH	低 pH 延缓细菌的生长, 但促进双乙酰的合成

注: CFU: 菌落形成单位; MLF: 苹果酸-乳酸发酵。
摘自 Bartowsky 和 Henschke (2004a)、Boulton 等 (1996)。

除了双乙酰，酒酒球菌也能合成高浓度的乙醇和其他次级代谢产物 (Tracey 和 Britz, 1989; Edwards 和 Peterson, 1994; De Revel 等, 1999; Maicas 等, 1999; Delaquis 等, 2000)。越来越多的研究结果说明，酒酒球菌具有 β-葡萄糖苷酶活性 (见 1.5.4)。β-葡萄糖苷酶能水解单葡萄糖苷，改变葡萄酒的风味特征 (Grimaldi 等, 2000; Boido 等, 2002; Mansfield 等, 2002; Ugliano 等, 2003; D’Incecco 等, 2004)。

Osborne 等 (2000) 报道，酒酒球菌能代谢乙醛生成乙醇和乙酸。这在某些情况下对生产有益，因为过量的乙醛可能导致葡萄酒的腐败 (Kotseridis 和 Baumes, 2000; Liu 和 Pilone, 2000)。但乙醛有助于红葡萄酒色泽的形成和性质的稳定。近来，Morneau 和 Mira de Orduna (2005) 发现，乙醛的降解依赖于菌株、pH 和 SO₂。

虽然酒酒球菌产生不同的挥发性化合物，但苹果酸-乳酸发酵对葡萄酒感官特性的作用，仍在进一步研究中。Kunkee 等 (1964) 和 Rankine (1972) 的早期工作表明，除了脱酸作用，苹果酸-乳酸发酵对于葡萄酒的感官特性没有产生明显的影响。另一方面，更多的研究显示，葡萄酒香气和风味上存在微小的变化 (McDaniel 等, 1987; Laurent 等, 1994; Henick-Kling, 1995; Sauvageot 和 Vivier, 1997; Nielsen 和 Richelieu, 1999; Delaquis 等, 2000; Gambaro

等, 2001; Boido 等, 2002)。例如, Sauvageot 和 Vivier (1997) 研究后发现, 夏敦埃酒完成苹果酸-乳酸发酵后, “榛子”味、“新鲜面包”味和“干水果”味更加浓郁, 而黑比诺葡萄酒失去了“草莓”味和“树莓”味。苹果酸-乳酸发酵不仅影响葡萄酒的风味和香气, 而且可以改善葡萄酒的酒体和口感, 后者可能是由于苹果酸-乳酸发酵产生了丙三醇和赤海藻糖等多羟基化合物 (Henick-Kling 等, 1994)。Pripis - Nicolau 等 (2004) 研究证实, 乳酸菌能够代谢甲硫氨酸合成 3-甲基-硫烷基-丙酸。该化合物具有“巧克力”或“烘烤”味, 理论上推断能增加经过苹果酸-乳酸发酵的葡萄酒的感官复杂性。



第3章 醋酸菌

3.1 引言

由于醋酸菌的生长会将乙醇氧化为乙酸（乙酸化过程），在葡萄酒生产中醋酸菌往往被认为是一种腐败微生物（Drysdale 和 Fleet, 1988; Du Toit 和 Pretorius, 2002）。此外，醋酸菌还可能产生一些其他的具有风味的代谢产物和多糖，如糖苷和果聚糖（Colvin 等, 1977; Tayama 等, 1986），而后者会对葡萄酒发酵后的澄清和稳定产生一定负面影响。

3.2 分类

醋酸菌属于醋酸杆菌科，革兰阳性菌，好氧，过氧化氢酶反应阳性的杆菌（Holt 等, 1994; Ruiz 等, 2000; Du Toit 和 Pretorius, 2002）。尽管在显微镜下可观察到不同种间及其种内不同菌株间存在很大的形态差异，醋杆菌属（*Acetobacter*）和葡糖杆菌属（*Gluconobacter*）在形态上一般呈杆状或椭圆状（De Ley 等, 1984）。即使纯培养物也会表现出各种各样的形态差异，它们可能单独地，成对地或者短链状形成棒状、曲线状或者丝状（见图 3.1）。

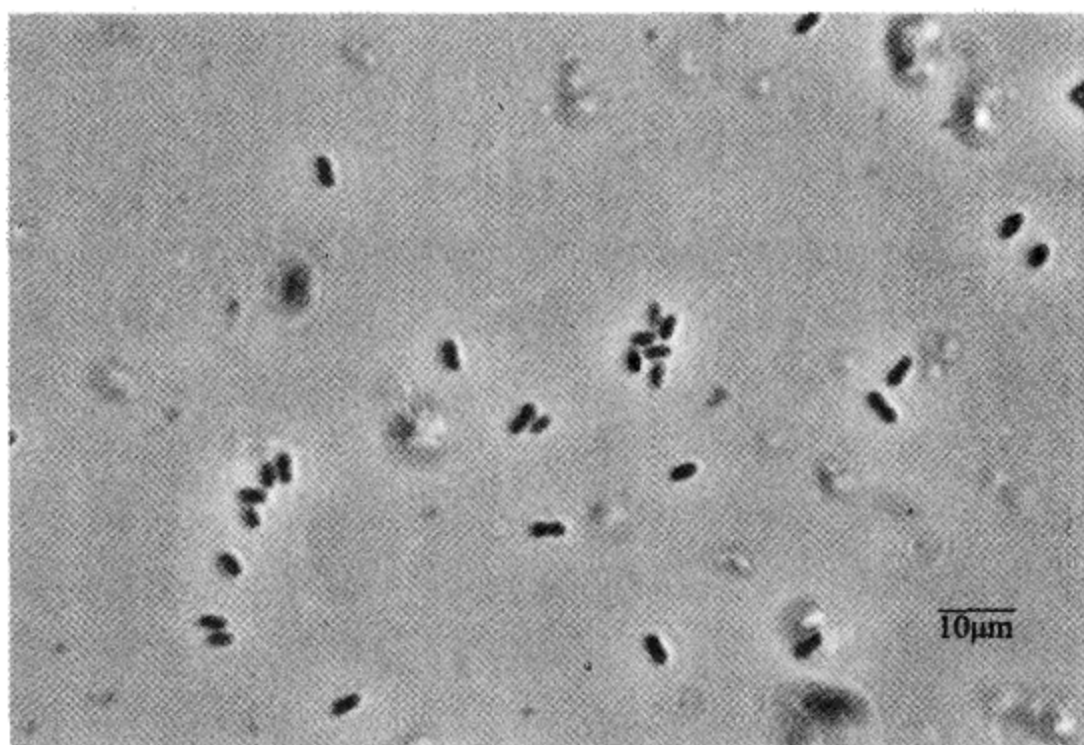


图 3.1 采用相差显微镜在 1000 × 放大倍数下观察到的醋酸菌的形态（图片由 WineBugs LLC 提供）

根据 Du Toit 和 Pretorius (2002) 的观点, 醋酸菌可以分为四个属: 醋杆菌属 (*Acetobacter*)、酸单胞菌属 (*Acidomonas*)、葡糖杆菌属 (*Gluconobacter*) 和葡糖酸醋杆菌属 (*Gluconoacetobacter*)。但伯杰氏手册最新版中认为, 醋酸菌只有醋杆菌属和葡糖杆菌属两个属 (De Ley 和 Swings, 1984; De Ley 等, 1984)。氧化葡糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*)、醋化醋杆菌 (*Acetobacter aceti*)、巴氏醋杆菌 (*A. pasteurianus*)、液化葡糖酸醋杆菌 [*Gluconacetobacter liquefaciens*, 以前称为液化醋杆菌 (*A. liquefaciens*)]、汉逊葡糖酸醋杆菌 [*Gluconacetobacter hansenii*, 以前称为汉逊醋杆菌 (*A. hansenii*)] , 是从葡萄和葡萄酒中分离得到的 (Vaughn, 1955; Joyeux 等, 1984a; Drysdale 和 Fleet, 1985; 1988; Du Toit 和 Lambrechts, 2002)。或许正是系统发育研究的应用, 才使得对醋酸菌中不同菌种进行了重新归类 (Cleenwerck 等, 2002)。Adams (1998) 阐述了醋酸菌的分类历史。

氧化葡糖酸杆菌通常在糖含量高、酒精含量低或没有酒精的环境中生长, 典型的筛选地点包括花和腐烂的水果。尽管可以在腐烂发酵的水果中找到醋杆菌, 但通常是从发酵的基质 (如葡萄酒、啤酒等) 中分离得到的。

3.3 营养需求

微生物的营养需求取决于可利用碳源和其他因素的变化。一些菌株需要 *p*-氨基苯甲酸、烟酸、硫胺素和/或泛酸 (De Ley 和 Swings, 1984; De Ley 等, 1984)。氨基酸并不能单独作为唯一的氮源和碳源, 但是醋杆菌属的一些菌能够在没有氨基酸、分别以 NH_4^+ 和乙醇作为唯一氮源和碳源的培养基上生长。De Ley 和 Swings (1984) 和 De Ley 等 (1984) 指出, 关于醋杆菌属或葡糖杆菌属生长的“必需”氨基酸目前尚不清楚。

因为醋酸菌一般在有氧条件下才能生长 (专性需氧微生物), 所以避免葡萄酒与氧的接触可以限制细菌的生长。然而事实表明, 醋酸菌在缺氧情况下并不一定死亡。实际上醋杆菌属在缺氧情况下可能处于一种“存活但无法培养” (viable - but - non - culturable, VBNC) 的状态 (见 6.5.2)。

3.4 代谢过程

3.4.1 碳水化合物

葡糖杆菌属可以糖醇 (甘露醇、山梨醇或甘油) 或者己糖 (葡萄糖或者果糖) 作为碳源。多数菌株可利用丙醇、丁醇、甘油、赤藻糖醇、甘露醇、阿拉伯糖、核糖、果糖、半乳糖、甘露糖和麦芽糖合成酸类物质 (De Ley 和 Swings, 1984)。

葡糖杆菌属缺少糖酵解途径中催化分解 6-磷酸果糖生成 1, 6-二磷酸果糖的磷酸果糖激酶（见图 1.7）。由于缺乏该途径，只能通过氧化磷酸戊糖途径（己糖单磷酸途径）来代谢葡萄糖（见图 3.2）。5-磷酸核糖到 6-磷酸果糖和 3-磷酸甘油醛的转化过程包括一系列转酮醇酶和转醛醇酶催化的羰基基团转移反应。形成的 3-磷酸甘油醛生成丙酮酸后，再转化成乙酸。尽管己糖单磷酸途径是葡糖杆菌属中糖代谢的主要途径，但 Olijve 和 Kok（1979）指出这条途径在 pH 3.5 ~ 4.0 时被抑制。然而，这些细菌在这个 pH 范围内是可以生长的，因此具有更大的营养需求。

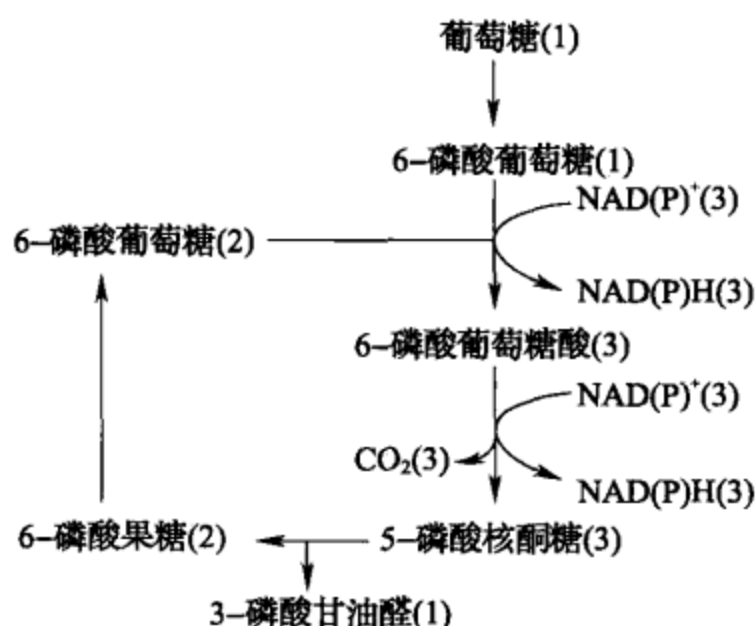


图 3.2 葡糖杆菌属利用葡萄糖的氧化磷酸戊糖途径

NAD (P)⁺ 是指所使用的辅酶 NAD⁺ 或 NAD (P)⁺

葡糖杆菌属不含有三羧酸循环途径（见图 1.9），因此不能氧化乙酸或者乳酸为 CO₂ 和水（De Ley 和 Swings, 1984）。但是，这些细菌可以直接将葡萄糖氧化成葡萄糖酸和少量的酮葡萄糖酸（Weenk 等, 1984; Seiskari 等, 1985）。根据菌株和环境条件的差异，在接种氧化葡糖酸杆菌的葡萄醪中葡萄糖酸大量积累，浓度可以达到 30g/L（Drysdale 和 Fleet, 1989a）。Weenk 等（1984）曾报道，当环境 pH 大于 3.5 及葡萄糖浓度小于 10mmol/L 时，葡萄糖酸的利用会受到抑制。

醋杆菌属所需碳源因菌种和菌株而不同。但在 De Ley 等（1984）的研究中，所有醋化醋杆菌菌株都可以乙醇、甘露醇、乙酸和乳酸为碳源，大部分菌株（>50%）可以丙醇、果糖和葡萄糖为碳源。De Ley 和 Schell（1959）也提到醋化醋杆菌可以利用多种糖、酸和醇类物质生长。相对而言，巴氏醋杆菌可以利用的碳源较少（乙醇、乙酸和乳酸），而液化醋杆菌可以代谢的碳源较多（乙醇、丙醛、赤藻糖醇、核糖醇、甘露醇、山梨醇、半乳糖、果糖、葡萄糖、葡萄糖酸、蔗糖、麦芽糖、醋酸、甘油酸和乳酸）。

与葡糖杆菌类似，醋杆菌可以通过氧化戊糖磷酸途径代谢糖类，但不同的是醋杆菌没有活跃的 Krebs 循环途径（Kitos 等, 1958）。由于缺乏或只有非常微

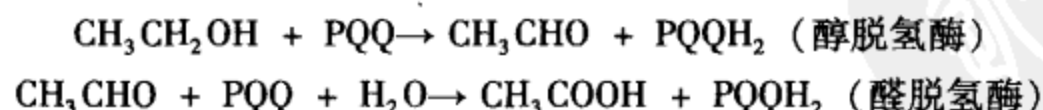
弱的糖酵解途径 (De Ley 等, 1984), 少数菌种可以氧化多醇生成相应的酮。醋酸和乳酸都可以被氧化为 CO_2 和水, 而且许多菌株可以利用葡萄糖生成 2-酮基葡萄糖酸、5-酮基葡萄糖酸和/或 2, 5-二酮基葡萄糖酸。醋杆菌生长优先利用的碳源有: 乙醇、甘油和乳酸 (按递减顺序排列)。

葡萄受灰葡萄孢霉 (*Botrytis cinerea*) 感染后, 浆果会脱水浓缩, 并生成甘油供醋酸菌利用。Sponholz 和 Dittrich (1985) 在感染葡萄孢属 (*Botrytis*) 的葡萄果实上检测到了葡萄糖酸和酮葡萄糖酸, 他们认为甘油的来源是醋酸菌而不是霉菌。在感染霉菌的葡萄果实中检测到甘油的浓度超过 15g/L (Dittrich 等, 1974; 1975; Nieuwoudt 等, 2002)。当甘油的浓度超过其感官阈值 4 ~ 5g/L 时, 它可以促使提高葡萄酒的甜味和酒体 (黏度), 然而这种感官效应近年来已受到了质疑 (Nieuwoudt 等, 2002)。

所谓的“生酮作用”是指甘油到二羟基丙酮的转化, 这个过程需要氧的参与, 并且当乙醇浓度 > 5% (体积分数) 时就会受到抑制 (Yamada 等, 1979; Aldercreuta, 1986)。葡萄酒中大量二羟基丙酮的存在也许可以反映出是葡萄孢属感染的浆果中“遗留”而来的, 而不是酒精发酵所产生的。Du Toit 和 Pretorius (2002) 总结了相关的研究, 指出葡萄酒中二羟基丙酮的浓度可以高达 2500mg/L。由于生酮作用会消耗甘油, 生成二羟基丙酮, 对葡萄酒的感官特性也许有重要影响 (Yamada 等, 1979; Drysdale 和 Fleet, 1989a; 1989b; Nieuwoudt 等 2002)。二羟基丙酮包含一个羰基, 可以与 SO_2 结合, 因此葡萄感染葡萄糖杆菌后, 需添加更多的亚硫酸盐 (Swings, 1992)。而且二羟基丙酮还可以与脯氨酸反应生成具有“类似烤面包香气”的成分 (Margalith, 1981)。

3.4.2 乙醇

尽管醋杆菌通过代谢碳水化合物可以产生微量乙酸, 但是多数乙酸是由乙醇的氧化反应生成的 (Eschenbruch 和 Dittrich, 1986)。这个过程需要两个膜结合酶, 即醇脱氢酶和醛脱氢酶 (Saeki 等, 1997)。醇脱氢酶可以氧化乙醇生成乙醛, 乙醛再被醛脱氢酶氧化生成乙酸:



吡咯喹啉 (PQQ) 是膜结合脱氢酶的一部分。与利用 NAD^+ 作为辅酶的许多其他微生物不同, 醋杆菌利用 PQQ 作为首选质子受体来转移上述反应生成的电子。电子首先被传输到泛醌 (见图 3.3), 然后再被一种膜结合的氧化酶重新氧化。最后, 氧气作为最终电子受体生成水和膜结合 ATP 酶产生能量所需的质子动力势。因此, 醋酸菌被认为是绝对需氧的好氧微生物, 被称为专性好氧菌。

尽管大多数葡萄糖杆菌可以在较低的乙醇浓度下 (< 5%, 体积分数) 氧化乙醇, 但即使在通气状态下, 它们也不能在含有乙醇的葡萄酒环境中生存 (Dry-

dale 和 Fleet, 1989b)。与此相反, 醋杆菌可以在更高浓度的乙醇中生长并且损坏葡萄酒的质量。Drysedale 和 Fleet (1989b) 和其他人已证明, 在大于 10% (体积分数) 乙醇的葡萄酒中醋杆菌能够生长。

醋酸菌可以产生浓度高达 250mg/L 的乙醛 (Du Toit 和 Pretorius, 2002), 而乙醛的感官阈值在 100 ~ 120mg/L (Berg 等, 1995), 因此在葡萄酒中乙醛引起了一种感官缺陷。乙醛的气味特征被描述为“坚果味”、“类似雪利酒”、“坏苹果味”、“生青味”、“青草味” (Zoecklein 等, 1995; Kotseridis 和 Baumes, 2000; Liu 和 Pilone, 2000)。

桶中陈酿的葡萄酒一般处于微氧环境, 乙酸菌一般产生乙醛而不是乙酸 (Drysedale 和 Fleet, 1989b), 推测是在低氧环境下醇脱氢酶处于活化状态而醛脱氢酶受到抑制造成的 (见图 3.3)。除了感官效应外, 乙醛还可以迅速与 SO_2 结合生成一种低挥发性且香气微弱的化合物。因此, 可以通过谨慎地添加硫化物来减轻乙醛引起的感官缺陷。

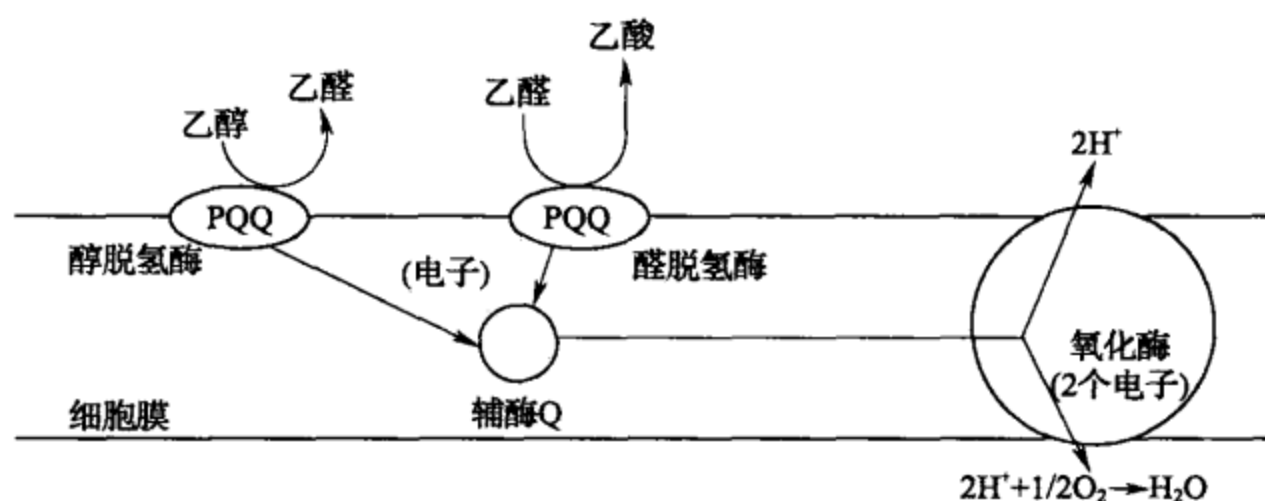


图 3.3 醋酸菌氧化乙醇生成乙酸 [摘自 Adams (1998)、Springer Science 和 Business Media]

除了乙酸和乙醛外, 醋酸菌还可以生成乙酸乙酯。这种酯具有刺激性, 其感官特性为“挥发性酸味” (见 11.3.1)。然而, 乙酸乙酯的合成受到氧的影响, 在微氧条件下, 仅能合成少量的乙酸乙酯 (Drysedale 和 Fleet, 1989b)。

第 4 章 霉菌和其他微生物

4.1 引言

霉菌是一类丝状真菌，可根据无性或营养菌丝体片段的形态和孢子的结构进行分类。霉菌的典型营养结构由各种菌丝组成，总称为菌丝体，包括三种类型：(a) 基内菌丝，称为假根，进入基质内部吸收和转运营养物质；(b) 匍匐菌丝，直径比基内菌丝大，用来连接菌丝体；(c) 气生无性繁殖菌丝，又称为分生孢子或者孢囊孢子。不同霉菌无性孢子的生长方式不同，有的可在封闭的结构（孢子囊）中生成，或者暴露在顶囊的顶端生成。孢子对霉菌的传播具有重要作用，它们可以通过气流或者昆虫进行传播。在合适的湿度和温度下，孢子发育成营养体（菌丝体），菌丝体可以继续进行散播或者形成孢子。

例如曲霉可以在一个称为分生孢子头的结构上产生无性孢子（分生孢子），包括一个庞大的囊泡和 1~2 层特殊的细胞（含有或不含初生小梗的次生小梗），典型结构如图 4.1 所示，分生孢子头包括分生孢子、分生孢子梗和基细胞。

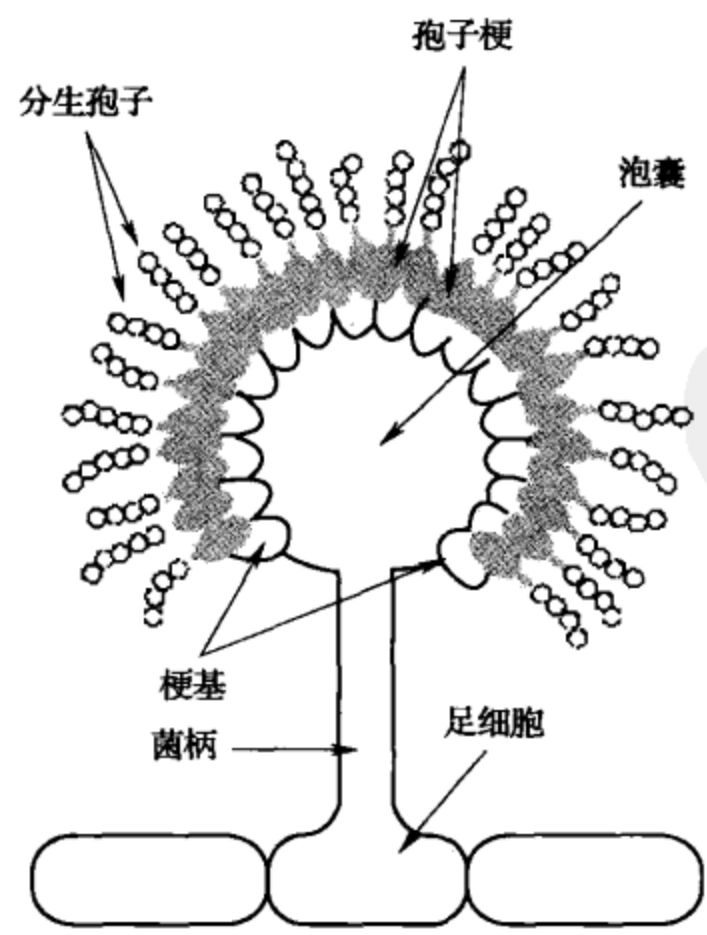


图 4.1 曲霉的基本结构 [摘自 Chang 等 (2000)]

4.2 生态环境

霉菌在葡萄表面上普遍存在,如曲霉(*Aspergillus*)、葡萄孢霉(*Botrytis*)和青霉(*Penicillium*),或者更严格地讲,是*Phytophthora*,*Moniliella*,*Alternaria*和*Cladosporium*等(Rosa等,2002)。霉菌对后期葡萄酒的物理化学稳定性和感官特性都有重要影响。例如,在葡萄收获前,若不控制葡萄表面霉菌的增殖,会引起后期二次污染微生物(酵母和细菌)的迅速繁殖,最终导致所谓的“腐败”。认识到霉菌的生长对葡萄酒质量的影响后,要尽可能多地了解包括葡萄感染程度的详细信息。根据霉菌生长及葡萄腐烂程度,酿酒师认为有必要调整原有的酿酒步骤(见7.5)。

尽管霉菌对酒精的耐受力较差,但霉菌在葡萄酒厂及其周围空气中广泛存在(Donnelly,1977)。在一次对葡萄酒酒窖的全面研究中,Goto等(1989)从6个法国酒厂、4个德国酒厂和1个日本试验酒厂中,共分离到108株霉菌,分别属于6个属,链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属、枝孢属(*Cladosporium*)、*Geosmithia*、青霉属(*Penicillium*)和轮枝孢属(*Verticillium*)。

霉菌可以在木制容器的内外表面生长,或者在出现渗漏的瓶装葡萄酒的木塞上生长。除了霉菌生长引起视觉影响外,霉菌还可以产生具有较强感官特征的代谢物,它们在百万分之一或万亿分之一数量级的浓度下仍能被感知。因此,这些代谢物对葡萄酒的质量具有重要影响(见4.5.3)。

4.3 分类

4.3.1 曲霉属(*Aspergillus*, 黑色霉菌)

无性繁殖状态的曲霉属于半知菌纲(以前称为不完全菌纲),曲霉最初生长时菌丝体为白色,类似于青霉,但是当分生孢子成熟后,菌落变成黑色。其中的一个菌种黑曲霉(*A. niger*),在炎热的气候条件下,是引起果穗腐烂病害的重要原因,因此它又被称为“炎热气候霉菌”(hot weather mold)。曲霉和根霉(*Rhizopus*)以及醋酸菌,与葡萄果梗腐烂和葡萄酒酸败密切相关。

4.3.2 葡萄孢属(*Botrytis*, 灰霉)

由灰葡萄孢霉引起的灰霉病可以影响许多植物以及存储中的水果和蔬菜。在低温和潮湿的气候下,这种病害更为严重,而且在褐色的腐烂表面覆盖有一层绒毛状的灰色霉菌(Alur,2000)。在生长初期菌落为白色,随着孢子的形成与成熟逐渐变为灰色。灰葡萄孢霉在葡萄表面上的生长见图4.2。尽管大多数情况下霉菌的生长会降低葡萄的品质,但在某些情况下霉菌的感染可以生产高质

量的甜型葡萄酒（贵腐酒）。

在生长初期，葡萄孢霉的菌丝可以通过细微的裂缝侵入浆果内部（Donèche, 1993），它们使葡萄皮变得松散，因此当浆果被轻轻积压时，葡萄皮就可以很容易地与果肉分离。这个现象使葡萄孢霉具有了“离皮”霉菌的称号。葡萄孢霉生长初期的另一个明显现象是使浆果褐变，一种所谓“*pourri plein*”的“巧克力”色调（Donèche, 1993）。

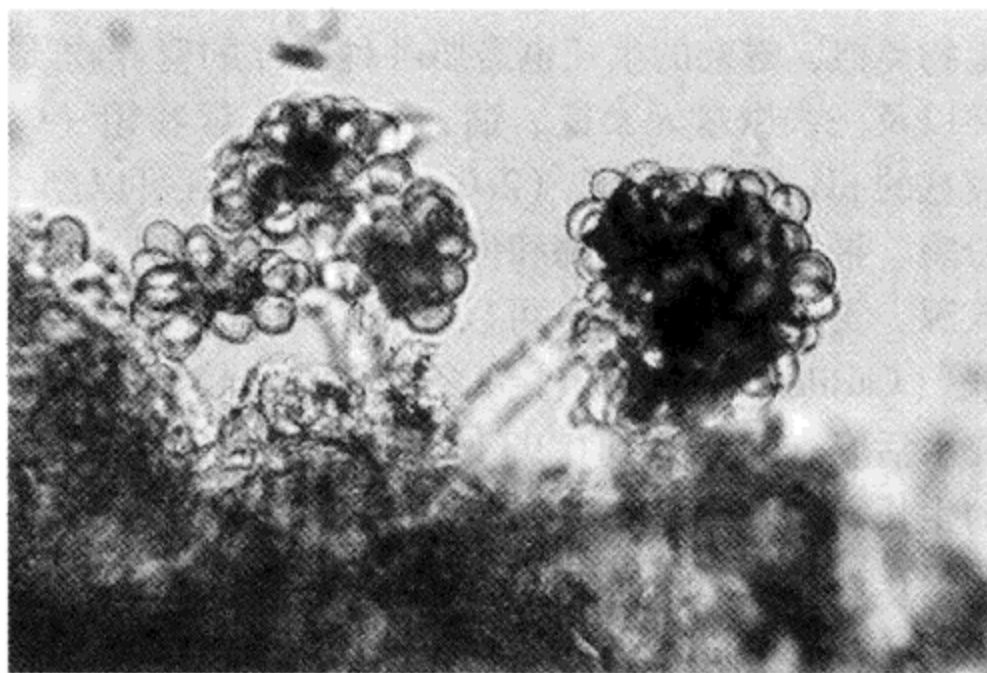


图 4.2 采用明视野显微镜在 400 × 的放大倍数下观察的灰葡萄孢霉的照片
（照片由 Winebugs LLC 提供）

当葡萄周围湿度相对较大（>90%）时，感染葡萄孢霉菌后，霉菌在 3d 内即可完成从萌发到孢子形成的整个过程。之后，灰霉病一般要经历两个（经常有重叠的）过程。感染灰霉病的最适温度在 15 ~ 20°C，最适相对湿度大于 90%（Bult 和 Lafon, 1970）。在这种环境下，葡萄孢霉和其他真菌（青霉、曲霉、枝孢属和根霉）以及乙酸菌都迅速繁殖，形成“果梗腐烂”（Jackson, 2000）。尽管灰霉病的产生最初认为是由初秋降雨引起，其他因素如雾、露、灌溉以及葡萄园在成熟季节较高的湿度也促进了灰霉病的感染。

感染葡萄孢霉后，在气候温暖、阳光充足和多风的季节，葡萄中的自由水分被蒸发，葡萄开始脱水，此时可以生产贵腐葡萄酒（Donèche, 1993）。尽管霉菌和细菌的生长会继续消耗一部分糖和酸，但脱水过程中糖和风味成分的增加可抵消这种消耗。采用这种葡萄发酵可以生产出高质量甜（白）型葡萄酒。

4.3.3 青霉属（*Penicillium*，蓝绿色霉菌）

青霉包括许多菌种，目前已鉴定出的就有 200 多种。一般情况下，青霉菌落生长很好，在很多培养基中可以形成孢子，呈灰绿色或者灰蓝色（Pitt, 2000）。如经常分离到的扩展青霉（*P. expansum*）（以前被命名为灰绿青霉 *P. glaucum*）可以引起苹果腐烂（Pitt, 2000）。该菌种可以使苹果、梨、番茄、

芒果、葡萄腐败，并且是果汁中霉菌毒素和棒曲霉素的主要来源。

大部分青霉可以在较低的温度范围内生长，在低于 5°C 下几乎也可以生长。由于具有低温生长的能力，导致青霉被称为“寒冷气候霉菌”（cold weather mold）。

4.4 营养需求

与其他微生物类似，霉菌的生长也需要各种各样的营养物质，包括硫化物、磷化物、镁和钾以及一些微量元素铁、铜、钙、锰、锌和钼（Carlile 等 2001）。大部分可以在较宽的 pH 范围内生长（2.0 ~ 8.5），并且可以产生各种各样的水解酶，例如淀粉酶、果胶酶、蛋白酶和酯酶。正因为如此，大部分霉菌可以利用多种碳源和氮源。实际上，*A. niger* 可以在仅以葡萄糖作为唯一有机营养物质的培养基上生长（Carlile 等，2001）。许多霉菌需在较低的水活度的条件下生长，葡萄孢霉在水活度（ A_w ）达到 0.93 时才会生成孢子（Alur, 2000）。

一般霉菌的生长需要较高的氧气，与它们对氧的需求相对应，在存储和浓缩的果汁中霉菌仅在被污染的表面生长。然而，扩展青霉和 *P. roqueforti* 可以在氧气浓度小于 2% 的条件下生长（Pitt, 2000）。

4.5 代谢

4.5.1 葡萄糖

尽管部分曲霉和青霉具有己糖磷酸支路或者氧化戊糖磷酸途径（见图 3.2），它们可以通过 EMB 途径（见图 1.7）利用葡萄糖，Donèche（1993）指出，*B. cinerea* 的新鲜菌丝（young mycelia）可以通过 Entner - Doudoroff 途径（图 4.3）氧化葡萄糖。这个反应生成的 3 - 磷酸甘油醛在酶的催化作用下氧化生成丙酮酸。由于霉菌都是专性需氧微生物，三羧酸和 Krebs 循环需要通过氧化磷酸化作用来激活。尽管一些有机酸可以由 Krebs 循环来合成，如柠檬酸、衣康酸、苹果酸，曲霉还可以通过葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖的过程中产生大量的葡萄糖酸（Chang 等，2000）。在氧化还原电位低的情况下，在甘油脱氢酶的作用下甘油可以大量积累（见图 1.8）。

4.5.2 真菌毒素

葡萄表面上生长某些霉菌，带来的主要问题是产生真菌毒素，例如赭曲霉毒素 A 和棒曲霉素（Scott 等，1977；Battilani 和 Pietri, 2002；Cabanès 等，2002）。棒曲霉素可以引起肠胃不适和皮疹，赭曲霉毒素 A 是一种潜在的致癌物质。现在已知能在葡萄上生长产生真菌毒素的霉菌包括：曲霉菌和青霉菌。近期 Rosa 等

(2002) 分离到 101 株黑曲霉 A, 其中 24 种可以产生赭曲霉毒素 A。同样, Moeller 等 (1997) 和 Abrunhosa 等 (2001) 发现, 当青霉接种到葡萄醪中时可以产生一种或多种真菌毒素 (isofumigaclavine A、isofumigaclavine B、羊茅麦角碱、棒曲霉素、roquefortine C 和 PR toxins 等)。另外, Esteban 等 (2004) 指出曲霉可以在较宽的温度范围内产生赭曲霉毒素 A。

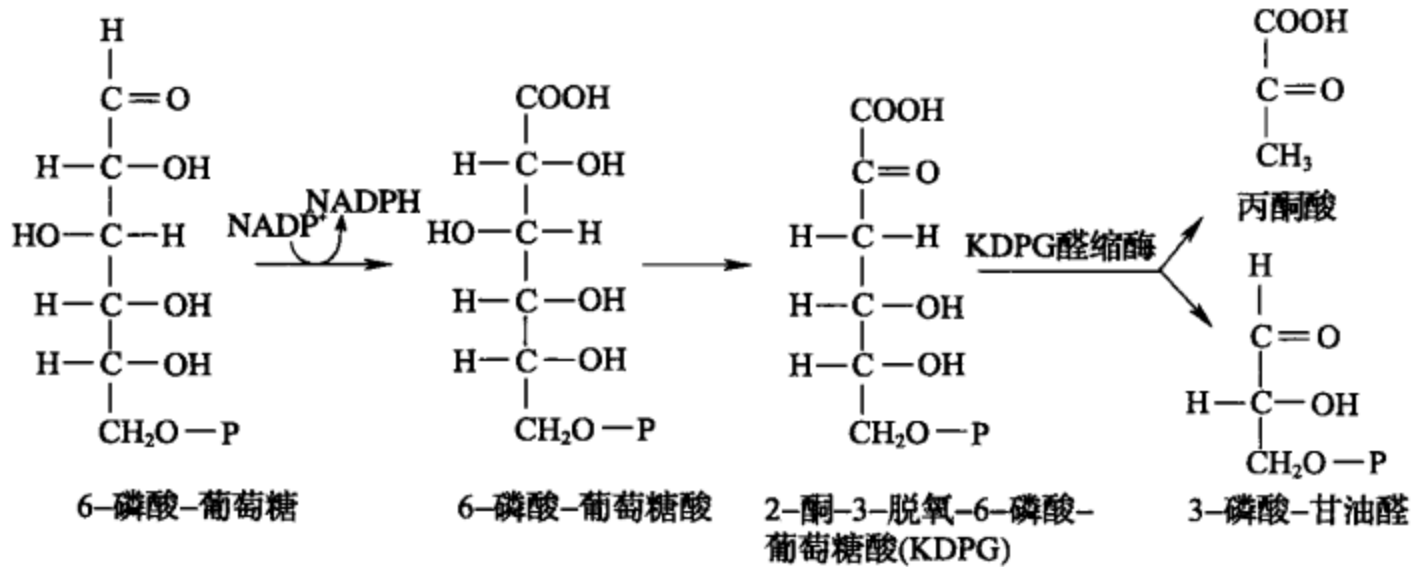


图 4.3 ED 途径 (Entner - Doudoroff pathway)

目前在阿根廷和巴西 (Rosa 等, 2002)、加拿大 (Ng 等, 2004)、法国 (Sage 等, 2004)、意大利 (Battilani 等, 2004)、葡萄牙 (Serra 等, 2003)、南非 (Stander 和 Steyn, 2002)、西班牙 (Bellí 等, 2004; Blesa 等, 2004) 和美国 (Siantar 等, 2003) 等国家的葡萄和葡萄酒中都已经检测出赭曲霉毒素 A。Stander 和 Steyn (2002) 指出在一些较晚采收的葡萄酿制的酒中, 赭曲霉毒素 A 的浓度高于其他葡萄酒, 这可能与葡萄采收前曲霉和/或青霉的生长有关。从 2005 年 1 月 1 日开始, 欧盟已规定在所有本国及进口的葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的最高浓度为 2.0 μg/L。

4.5.3 风味成分

霉菌可以生成葡萄酒中的许多风味物质, Kaminsk 等 (1974) 报道曲霉和青霉可以生成 3-甲基丁醇、3-辛酮、3-辛醇、1-辛烯-3-醇、1-辛醇和 2-辛烯-1-醇, 以及许多高级醇 (异丁醇和苯乙醇)、醛类 (包括苯甲醛) 和酮类。在上述物质中, 1-辛烯-3-醇具有“霉味”或者“蘑菇味”, 是最主要的香气成分, 占总挥发性成分的 36.6% ~ 93.1%。霉菌也可以合成其他具有“霉味”或“腐臭”的物质 (图 4.4)。

灰葡萄孢霉可以代谢一些芳香萜烯类化合物, 包括芳樟醇、香叶醇和橙花醇, 同时合成一些挥发性低的物质, 如 β-蒎烯, α-萜品醇和其他氧化物 (Nigam, 2000)。而且霉菌还可以产生酯酶, 可以降解赋予白葡萄酒水果风味的酯类, 还可以合成葫芦巴内酯 (sotolon) (“类似蜂蜜”) 和 1-辛烯-3-醇 (Nigam, 2000)。

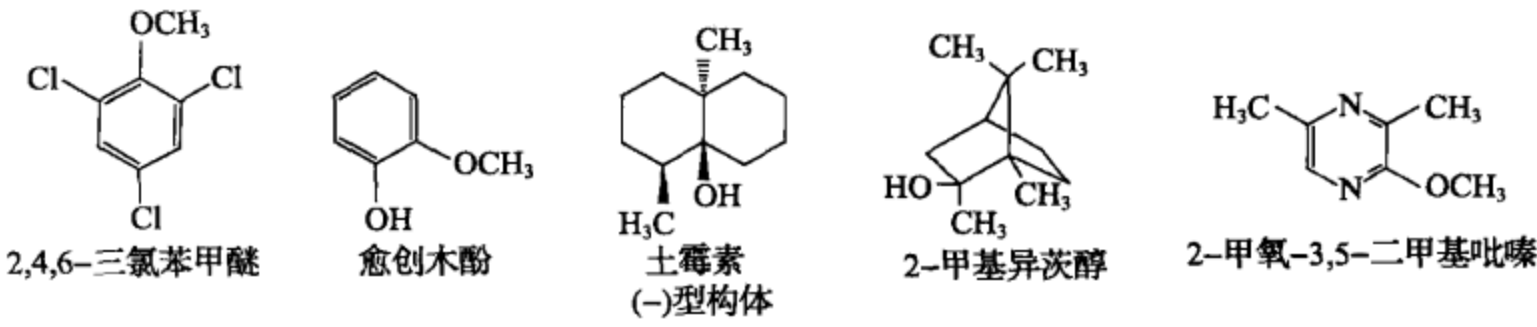


图 4.4 葡萄酒中其他具有“霉味”的物质结构

霉菌还可以产生大量的甘油，甘油是醋酸菌的碳源，Ravji 等（1988）研究了葡萄园中 4 种常见腐败霉菌——灰葡萄孢霉（灰霉腐败）、黑曲霉（黑霉腐败）、柑橘青霉（*Penicillium italicum*）（青霉腐败）和黑根霉（*Rhizopus nigricans*）（根霉腐败）的甘油合成过程。结果表明，单位菌丝的甘油生成量不仅与霉菌有关，而且与葡萄品种和葡萄汁的提取方法有关。

4.6 其他微生物

4.6.1 芽孢杆菌属（*Bacillus*）

芽孢杆菌属由革兰阳性（有时革兰特性不确定）、好氧、过氧化氢酶阳性和产孢子的微生物组成。由于这些细菌通常来源于土壤，一般很少在酒精饮料中发现芽孢杆菌。Gini 和 Vaughn（1962）曾报道在腐败葡萄酒中发现了枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）、环状芽孢杆菌（*B. circulans*）、凝结芽孢杆菌（*B. coagulans*）。Murrell 和 Rankine（1979）从白兰地中分离到一株巨大芽孢杆菌（*B. megaterium*）。最近 Bisson 和 Kunkee（1991）等多位研究者报道了从东欧葡萄酒中分离到芽孢杆菌，其中 Kunkee（1996）指出在瓶装葡萄酒中芽孢杆菌的存在不影响口感和味感。因此，芽孢杆菌对葡萄酒的影响仅在于产生沉淀和浑浊。除了葡萄酒，在橡木塞上也发现了枯草芽孢杆菌（Alvarez - Rodriguez, 2003）。

苏云金芽孢杆菌（*B. thuringiensis*）常用作葡萄的生物杀虫剂，因此也可以从酿酒厂发酵的葡萄汁中分离得到（Bae 等，2004）。尽管苏云金芽孢杆菌在葡萄酒中能够存活，但是它的生长和繁殖受到抑制。

4.6.2 梭菌属（*Clostridium*）

由于葡萄酒正常情况下呈酸性（pH < 4.0），因此有关葡萄酒中梭菌的报道非常少。根据 Sponholz（1993）的研究，这种菌仅在低酸、高 pH（> 4.0）的葡萄、苹果汁和葡萄酒中生长。这些细菌通过合成 *n* - 丁酸导致葡萄酒“酸败”。

4.6.3 链霉菌属 (*Streptomyces*)

链霉菌与橡木塞及葡萄酒厂中的“霉味”化合物有一定的关系 (Silva Pereira等, 2000)。其中的一种霉味物质是2, 4, 6-三氯苯甲醚 (Buser等, 1982)。最近, Mara和Bisson (2005) 从葡萄酒厂的不同环境中分离得到了150株链霉菌, 其中有12株可以很好地在三氯苯酚中生长, 并合成2, 4, 6-三氯苯甲醚。因此, 他们认为不同酒厂中的2, 4, 6-三氯苯甲醚是由链霉菌的不同菌种或菌株产生的。

除三氯苯甲醚外, 其他的代谢物如愈创木酚、土霉素、2-甲基异樟醇和2-甲氧基-3, 5-二甲基吡嗪 (图4.4) 也可以产生“发霉”或者“陈腐”的气味 (Silva Pereira, 2000; Simpson, 2004)。此外, Silva Pereira等 (2000) 指出其他微生物也会造成橡木塞污染。例如, *Armillaris mellea* 可以产生一种腐臭的气味, 这种微生物可以感染橡树并在橡木塞上产生“黄色的斑点”。

其他霉菌或细菌在橡木塞上生长时, 在葡萄酒中能检测到另一种物质——愈创木酚。霉菌可以降解香草酸产生愈创木酚和其他物质 (见图4.5)。Simpson (1986) 早期研究表明, 被污染的葡萄酒中含有0.07~2.63mg/L的愈创木酚, 而未污染的葡萄酒中愈创木酚浓度就很低, 为0.003~0.006mg/L。

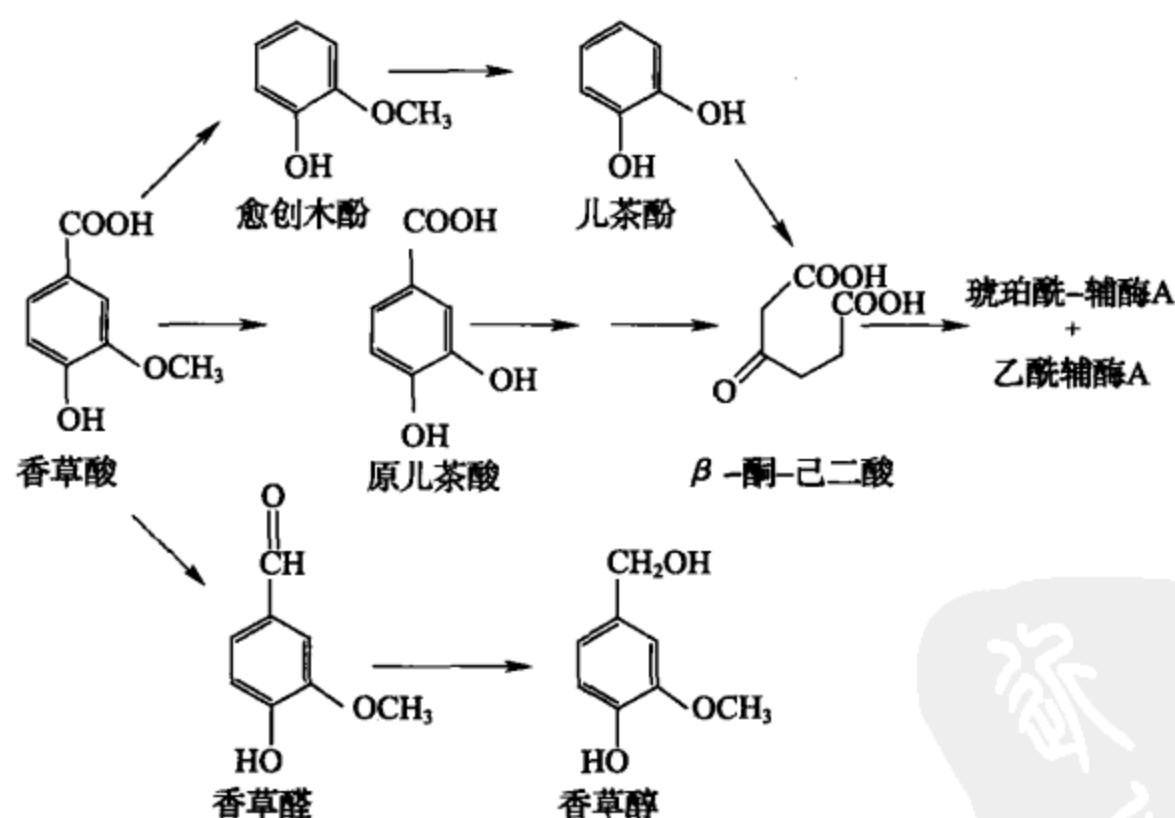


图4.5 从橡木塞上分离到的链霉菌转化香草酸、愈创木酚、邻苯二酚和其他一些化合物 [摘自Álvarez-Rodríguez等 (2003)]

由链霉菌和一些蓝细菌 (*Cyanobacteria*) 以及霉菌产生的具有风味活性的代谢物有土霉素 (反-1, 10-二甲基-反-9-萘烷醇) 和2-甲基异樟醇。土霉素具有一种“煮熟的甜菜味”、“泥土味”, 或者“刚耕过的土味”, 而2-甲基异樟醇具有类似的“土味”或者“霉味”。Darriet等 (2001) 在有“霉味”的

赤霞珠葡萄酒中检测到的土霉素，主要是（-）型异构体，其阈值比（+）型土霉素要低。他们进一步确定链霉菌和青霉都可以合成（-）型土霉素。由于可以在刚破碎的葡萄中发现土霉素（Darriit, 2000），因此说明葡萄上生长的微生物也可能导致葡萄酒产生“霉味”。



第二篇

葡萄酒酿造与生产过程



第5章 微生物生长及其控制

5.1 引言

在葡萄酒酿造过程中，加强关键环节处微生物生长及其控制，对顺利完成整个发酵过程至关重要。这不仅涉及酿酒酵母的发酵优化，还涉及对不良酵母和细菌的生长及其控制。例如，我们一般要尽量防止微生物污染，但一些酿酒师在酿造红葡萄酒时也会适当利用酒香酵母的作用。对微生物的控制可采用：化学添加剂（防腐剂和杀菌剂）、物理除菌（过滤或其他方法）以及控制窖、罐温度等方法。

5.2 防腐剂和杀菌剂

化学防腐剂可以抑制微生物（如细菌类和真菌类微生物）的生长，但不能将其完全杀灭；正确使用杀菌剂可完全杀灭目标微生物（如细菌类和真菌类微生物）。在葡萄酒酿造期间，不能把 SO_2 等防腐剂当作控制不良微生物的“良方”。尽管可单独使用防腐剂，但是某些防腐剂的配合使用，可发挥协同作用，从而显著增强其效果（例如，两种防腐剂的配合使用，其效果会大大超过单一防腐剂的使用效果）。

本节主要内容包括葡萄酒酿造过程常用防腐剂和杀菌剂的一般使用方法，以及过滤操作等。许多添加剂都可用来控制微生物的生长，这包括 SO_2 、溶菌酶、焦碳酸二甲酯、山梨酸等。同时，还开发出了其他添加剂，如延胡索酸、乳酸链球菌素、CO、部分植物提取液等。此外，第9章将论述葡萄酒厂中常被用作消毒剂的其他化学试剂。

5.2.1 二氧化硫（ SO_2 ）

SO_2 由于具有良好的抗氧化及抗菌特性，被广泛用于葡萄酒及食品工业。在美国葡萄酒中允许的 SO_2 添加量是 350mg/L ，这高于酿酒师推荐使用的浓度。然而，葡萄酒标签中标示的 SO_2 含量常大于 10mg/L ，这是由于 SO_2 也是酵母菌在发酵期间的代谢产物（见 1.5.2），即使在酿造期间不添加任何硫化物，通常也会

含有部分硫化物。

5.2.1.1 SO_2 的存在形式

溶于水的 SO_2 ，存在分子态 SO_2 (molecular SO_2 , $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)，亚硫酸氢根离子 (HSO_3^-)，亚硫酸根离子 (SO_3^{2-}) 三种形式，两两之间处于一种动态平衡。具体如下所示：



这种平衡依赖于 pH 的变化，在葡萄酒中 (pH3 ~ 4)，主要的存在形式是亚硫酸氢根离子 (见图 5.1)。分子态 SO_2 和亚硫酸存在离子动态平衡，此外，亚硫酸氢根离子也存在游离态和结合态两种形式。 SO_2 将与羰基化合物 (如乙醛) 反应，形成其他副产物，如羟基磺酸 (hydroxysulfonic acid)。

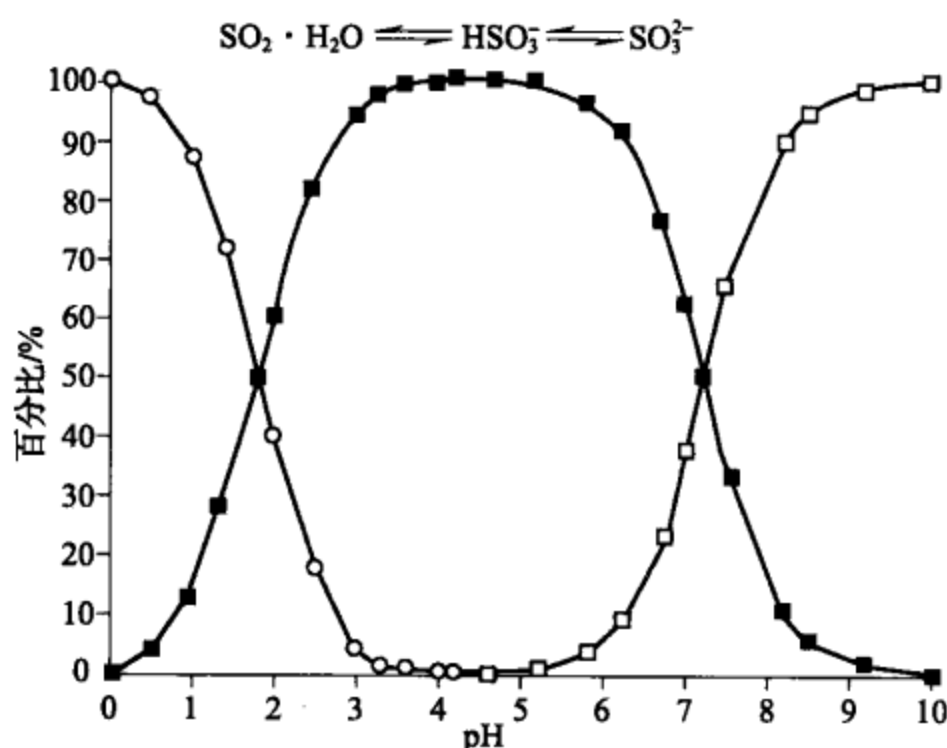
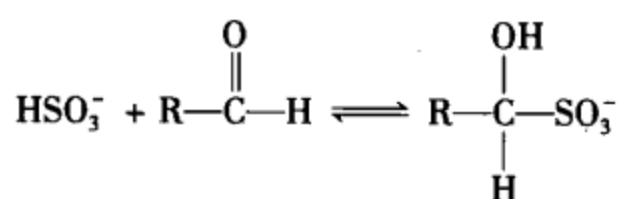


图 5.1 不同 pH 条件下， SO_2 、 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 的比例变化

除了乙醛，还有许多物质可与 HSO_3^- 发生反应，如丙酮酸、 α -酮基戊二酸，二羟基丙酮，双乙酰、花色素苷及其他物质 (Ough, 1993b)。



5.2.1.2 微生物抑制

一般认为，分子态 SO_2 是 SO_2 的主要抑菌形式。这是因为 $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 不带有电荷，可以快速扩散进入细胞，通常在细胞质 pH6.5 的条件下发生电离，形成相应的亚硫酸氢根和亚硫酸根离子。随着胞内 $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 含量的减少，更多的 $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 进入细胞，细胞内浓度随之增加。

常规方法不能直接测定葡萄酒中 $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 含量。其浓度需要根据已知游离态 SO_2 和葡萄酒 pH，依照相应公式进行计算。

$$[\text{分子态 SO}_2] = \frac{[\text{游离态 SO}_2]}{[1 + 10^{\text{pH}-1.8}]}$$

此外，利用图 5.2 所示数据，可估算不同 pH 条件下，产生 0.5mg/L 或 0.8mg/L 分子态 SO_2 所需的游离态 SO_2 数量。

SO_2 可以通过不同形式来抑制微生物生长，如可使蛋白质中的二硫键断裂，与 NAD^+ 和 FAD 中的辅因子起反应。它也可以与 ATP 反应，造成胞嘧啶脱氨，形成尿嘧啶，增加了致死突变的几率。 SO_2 也可导致关键营养成分分解（Ough, 1993b; Romano 和 Suzzi, 1993）。具体来说， SO_2 可导致硫胺素（维生素）分解，形成不能被代谢利用的成分（见图 5.3）。尽管在葡萄酒酿造中通常不存在该问题，若用于发酵的葡萄汁已保存了一段时间，则维生素 B_1 （硫胺素）的损失也是不容忽视的。在美国，盐酸硫胺素的最大允许添加量是 0.6mg/L。

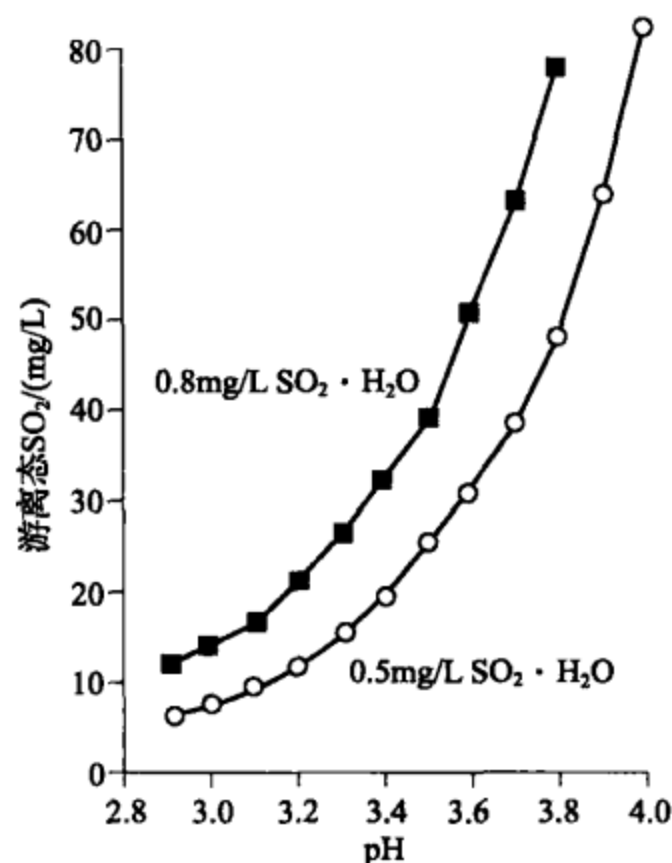


图 5.2 在一定 pH 条件下，产生 0.5mg/L 或 0.8mg/L 分子态 SO_2 所需游离态 SO_2 含量

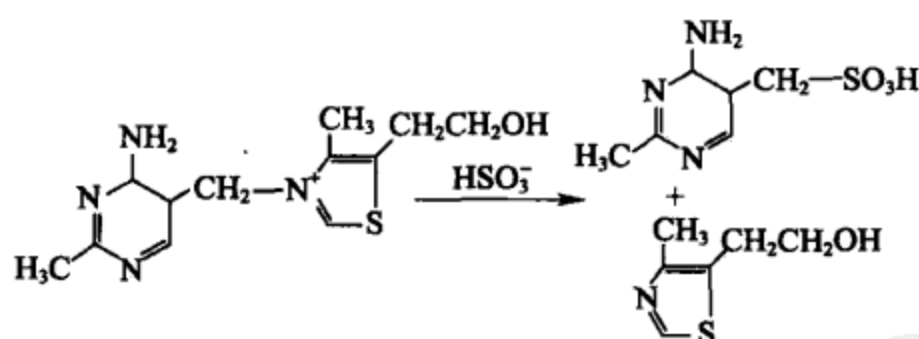


图 5.3 SO_2 引起硫胺素断裂的反应

抑制微生物繁殖所需的分子态 SO_2 的浓度因葡萄汁（葡萄酒）pH、温度、微生物数量与种类、生长期、酒精度以及其他因素不同而异。Beech 等（1979）研究认为，为使白葡萄佐餐酒中腐败微生物的数量在 24h 内降低 10^4 CFU/mL，分子态 SO_2 的推荐用量为 0.8mg/L。研究发现葡萄酒中不同种属的酵母和细菌对 SO_2 的耐受性存在差异（Warth, 1977; 1985; Du Toit 等, 2005）。例如，Davis 等（1988）比较从澳大利亚红葡萄酒中分离到的乳酸菌，发现酒明串珠菌（酒球菌）对 SO_2 的耐受性不及小片球菌。Davis 等（1988）进一步研究认为，葡萄酒中总 SO_2 浓度较高时，对小片球菌的促进作用要强于酒明串珠菌。相反，Hood

(1983) 报道认为, 片球菌对结合态 SO_2 的耐受性不及乳酸杆菌 (*lactobacilli*) 和明串珠菌。在实际生产中, 为抑制葡萄酒陈酿过程中的酒香酵母, 许多酿酒师常用的分子态 SO_2 浓度为 $0.4 \sim 0.6 \text{ mg/L}$ 。为抑制巴氏醋酸杆菌的生长, Du Toit 等 (2005) 建议分子态 SO_2 的用量为 0.8 mg/L , 但该用量不足以完全杀灭醋酸菌。

部分酿酒师会采取措施促进非酿酒酵母的生长, 也有些酿酒师认为非酿酒酵母会产生不良风味和气味, 所以应控制其生长。然而在酒精发酵起始前添加 SO_2 , 能够抑制非酒精酵母数量的增长, 但在除梗破碎时加入 SO_2 , 并不能抑制具有 SO_2 耐受性的酵母菌数量 (Constantí 等, 1998; Egli 等, 1998; Henick-Kling 等, 1998; Ciani 和 Pepe, 2002; Cocolin 和 Mills, 2003)。事实上, 为抑制某些酵母菌如毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、结合酵母等的生长, 分子态 SO_2 的用量至少为 2 mg/L 。由于分子态 SO_2 的浓度与 pH 关系密切, 在葡萄酒环境中很难达到这样的浓度。微生物产生 SO_2 抗性的机制各不相同, 其差异与细胞膜扩散速率、能与 SO_2 结合的物质生物合成、酶敏感性的差异等有关 (Romano 和 Suzzi, 1993)。

5.2.1.3 SO_2 的添加

SO_2 可以压缩气体、焦亚硫酸钾等形式添加到葡萄汁或葡萄酒中, 或以燃烧的方式在橡木桶内进行添加。以压缩气体形式添加时, 若气体纯度为 90%, 要求添加的浓度为 30 mg/L 时, 其计算方法如下:

$$\frac{30 \text{ mgSO}_2}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ lb}}{454 \text{ g}} \times \frac{3.8 \text{ L}}{1 \text{ gal}} \times \frac{1}{0.90} \times 1000 \text{ gal} \\ = 0.279 \text{ lbSO}_2/1000 \text{ gal}$$

注: lb 表示磅 ($1 \text{ lb} = 0.373242 \text{ kg}$), gal 表示加仑 ($1 \text{ gal} = 3.78541 \text{ L}$), 下同。

多数情况下, SO_2 是以偏重亚硫酸钾的形式添加到葡萄汁或葡萄酒中的。理论上, 一分子 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 可产生两分子 SO_2 , 其得率可由下式计算:

$$\frac{2\text{SO}_2}{\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5} = \frac{\text{S}_2\text{O}_4}{\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5} = \frac{128.12}{222.32} = 0.576$$

从上述公式可知, 理论上 57.6% 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 可转化成 SO_2 。在较长的贮存阶段, 其实际分解产生的 SO_2 要低于这个值。

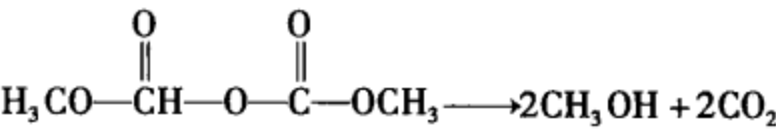
基于上述 SO_2 与 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 之间的比例关系, 可通过计算获得 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的添加量 (g/L 或 lb/1000gal)。如, 若需产生 30 mg/L SO_2 , 其添加数量可用下式计算:

$$\frac{30 \text{ mgSO}_2}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ lb}}{454 \text{ g}} \times \frac{3.8 \text{ L}}{1 \text{ gal}} \times \frac{1}{0.576} \times 1000 \text{ gal} \\ = 0.436 \text{ lbK}_2\text{S}_2\text{O}_5/1000 \text{ gal}$$

5.2.2 碳酸二甲酯

杀菌剂碳酸二甲酯 (DMDC), 商品名为维果灵 (Velcorin), 在美国已被批

准允许销售，在低醇和脱醇葡萄酒中，最大限量为 200mg/L（Ough，1993a）。美国食品与药物管理局（The United States Food and Drug Administration，FDA）也允许在果汁饮料及非碳酸饮料中使用 DMDC（Anonymous，1987）。因为 DMDC 将水解生成 CO₂和甲醇，所以不会有残留。



已由试验获得了 DMDC 对许多葡萄酒微生物的抑制浓度（Daudt 和 Ough，1980；Porter 和 Ough，1982；Ough 等，1988a）。在酒精度为 10% 的葡萄酒中，25mg/L 的浓度可有效抑制酿酒酵母、酒香酵母、裂殖酵母等微生物的生长（Ough，1993a）。该添加剂对乙酸菌和乳酸菌也有抑制效果（见表 5.1）。尽管有报道认为，DMDC 和 SO₂对酿酒酵母的抑制具有协同作用，但在 Renee Terrell 等（1993）的研究中并未发现。他认为单独使用 DMDC 比与 SO₂或山梨酸结合使用的效果更好，尤其在高温条件下对果汁的发酵抑制效果更佳。

表 5.1 利用 DMDC 控制酵母菌及细菌（接种量 500CFU/mL）生长的浓度

微生物	DMDC/（mg/L）
酵母菌	
克鲁假丝酵母（ <i>Candida krusei</i> ）	100 ~ 200
异常汉逊酵母（ <i>Hansenula anomala</i> ）	25 ~ 50
柠檬形克勒克酵母（ <i>Kloeckera apiculata</i> ）	25 ~ 50
红酵母属（ <i>Rhodotorula</i> spp.）	30 ~ 200
酵母菌（ <i>Saccharomyces</i> spp.）	40 ~ 200
拟酵母（ <i>Torulopsis</i> spp.）	75 ~ 100
结合酵母（ <i>Zygosaccharomyces</i> ）	50 ~ 150
细菌	
巴氏醋酸杆菌（ <i>Acetobacter pasteurianus</i> ^a ）	190 ~ 250
<i>Lactobacillus brevis</i>	200
<i>Lactobacillus buchneri</i>	30
片球菌（ <i>Pediococcus</i> ）	300

注：a 接种量为 250CFU/mL。
引自 Ough（1993a）和 J. Just（私人交流，2005）。

DMDC 的抗菌作用是由于一些酶的失活（Ough，1993a）。Porter 和 Ough（1982）认为其抗菌机理是发酵途径中 3 - 磷酸甘油醛脱氢酶和乙醇脱氢酶失去了活性。

尽管 DMDC 使用效果很好，但在剂型和使用剂量上仍存在困难。首先，DMDC 仅能微溶于水，所以需经充分混合才能保证在瓶装葡萄酒中分布均匀。

其次, DMDC 的熔点为 15.2°C , 所以在添加前必需稍微加热。考虑到这些限制因素, 在每次添加时需利用特定设备来确定 DMDC 的最佳用量。

5.2.3 溶菌酶

溶菌酶是一种来源于蛋清的低分子蛋白质 ($14\ 500\text{u}$), 能够引起革兰阳性菌的细胞壁裂解 (酒球菌属、乳杆菌属和片球菌属)。革兰阴性菌起保护作用的外层限制了溶菌酶对该类细菌的作用。溶菌酶对酵母和霉菌不起作用。

利用其特性, 在白葡萄酒、玫瑰葡萄酒和浅玫瑰红葡萄酒的生产过程中, 生产者都会运用溶菌酶, 来防止苹果-乳酸发酵和减少发酵前期乳酸菌的起始数量。Gerbaux 等 (1997) 曾报道在发酵前添加 500mg/L 溶菌酶能够抑制苹果酸-乳酸发酵。但是如果在酒精发酵后添加, 考虑到葡萄酒的微生物稳定性, 其添加量要减少到 $125\sim 250\text{mg/L}$ 。Delfini 等 (2004) 曾报道, 乳杆菌属和片球菌属的不同菌种对溶菌酶的敏感性存在差异, 有些菌株的耐受浓度达到 500mg/L 。这两种属的耐受浓度总体上高于酒球菌属。目前, 在美国溶菌酶的允许添加浓度为 500mg/L 。

由于溶菌酶是一种蛋白质, 酚类物质的存在和酒体澄清都会影响其活性。众所周知, 植物来源的酚类物质可与酶蛋白质发生反应进而降低酶的活性。与此相对应, 溶菌酶在白葡萄酒中的活性要高于红葡萄酒中的活性, 这可能是由于酒中酚类物质的不同。Daeschel 等 (2002) 报道在赤霞珠葡萄酒中溶菌酶的活性在 28d 后会大幅下降, 而在雷司令葡萄酒中则不会出现该现象。Delfini 等报道溶菌酶会与悬浮固形物结合, 因此澄清处理后会使得酶的活性降低。

溶菌酶也会影响白葡萄酒中的蛋白质稳定性。因此, 在装瓶之前, 应对经过酶处理的葡萄酒进行下胶试验。尽管缺乏相关证据, 但与红葡萄酒中使用的其他蛋白质下胶材料类似, 溶菌酶的使用会对味觉有间接的影响。

5.2.4 山梨酸

山梨酸 (2, 4-己二烯酸) 是一种短链脂肪酸, 常用于葡萄汁及甜型瓶装葡萄酒中, 以防止酿酒酵母的二次发酵 (De Rosa 等, 1983; Renee Terrell 等, 1993)。在美国山梨酸的最大允许添加浓度为 300mg/L , 而国际葡萄与葡萄酒组织 (O. I. V.) 所允许的最大添加量为 200mg/L 。生产中, 山梨酸的推荐用量为 $100\sim 200\text{mg/L}$, 该浓度能有效抑制酿酒酵母的生长, 但对其他酵母却表现出不同的抑制特性 (Warth, 1977; 1985)。例如, 柠檬形克勒克酵母和异常毕赤酵母在 $156\sim 168\text{mg/L}$ 浓度下会受到抑制, 而要抑制粟酒裂殖酵母和拜耳接合酵母, 需要的浓度至少应为 672mg/L (Warth, 1985)。关于抑菌机制尚不完全清楚, 推测可能是由于细胞结构上的不同、遗传物质的变化、细胞膜的改变、酶或运输功能的抑制造成的 (Sofos 和 Busta, 1993)。

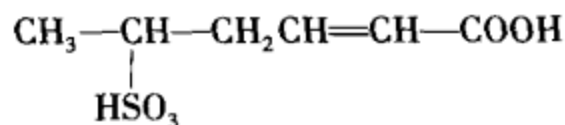
山梨酸对细菌没有作用。实际上,许多细菌可以分解山梨酸,形成2-乙氧基-3,5-己二烯,它赋予葡萄酒一种特殊的“天竺葵”(geranium)气味(见11.3.5)。在用山梨酸处理过的腐败葡萄酒中,检测到的其他风味物质有1-乙氧基-2,4-己二烯和山梨酸乙酯(Chisholm 和 Samuels, 1992),而后者与起泡葡萄酒中的不良风味有关(De Rosa 等, 1983)。然而 Chisholm 与 Samuels (1992) 描述山梨酸乙酯拥有一种“蜂蜜”或“苹果”的香味, De Rosa 等 (1983) 则认为这种化合物经过短期(6个月)储存,产生一种使人非常不愉快的“凤梨-芹菜”的味道。基于这一现象, De Rosa 等 (1983) 建议,不要在起泡葡萄酒中添加山梨酸。

山梨酸在水中溶解性差(室温下溶解度为1.5g/L),通常添加溶解性好的固态盐——山梨酸钾(58.2g/L)。计算山梨酸钾的添加量时,需要考虑盐与酸分子质量的不同:

$$\text{所需添加的浓度} = \frac{150.22\text{g/mol (盐)}}{112.13\text{g/mol (酸)}} \times \text{期望的最终浓度 (mg/L)}$$

应该先将山梨酸钾在葡萄酒或者水里溶解,再加入葡萄酒。

人们认为 SO_2 和山梨酸具有协同作用,能降低控制酵母发酵所需的山梨酸浓度。Ough 和 Ingraham (1960) 对此进行了证实,将 SO_2 与山梨酸均以 80mg/L 浓度添加至增甜型瓶装葡萄酒时,比单独使用 SO_2 (130mg/L) 或山梨酸 (480mg/L) 具有更强的抑制作用。相反, Parish 和 Carroll (1988) 则报道 SO_2 和山梨酸盐对于酿酒酵母有拮抗作用。每种物质单独作用要强于结合使用的效果。这种拮抗机制可能是由于山梨酸盐和 SO_2 反应生成如下化合物的结果 (Heintze, 1976):



如果要提高甜型葡萄酒的稳定性,应该在装瓶前加入山梨酸。添加时应使用不锈钢或其他可清洗消毒的容器,避免使用木质容器进行装瓶前的混合与储存。因为残留在木质的山梨酸,能被乳酸菌代谢产生“天竺葵味”物质,这种味道能持续不断地侵入葡萄酒中。

乙醇含量决定了山梨酸的添加量。尽管 Ough 和 Ingraham (1960) 推荐,酒精度为 10% ~ 11% (体积分数) 的葡萄酒中,山梨酸的添加量为 150mg/L。随着酒精含量的增加,山梨酸的添加浓度降低至 100mg/L (12%) 或 50mg/L (14%)。

5.2.5 其他防腐剂和杀菌剂

检验合格后,其他多种抗菌试剂可用于控制果汁和葡萄酒中不良酵母和细菌的活性。通常这些抗菌试剂未能商业化,基本都停留在实验室规模。

5.2.5.1 延胡索酸

美国酒、烟税收与贸易局已批准延胡索酸的使用。延胡索酸可抑制乳酸菌的生长,同时作为一种酸味剂,最大添加浓度为 3.0g/L。延胡索酸作为一种相对较强的酸,在葡萄酒中可作为酸味剂使用,以便替换较为昂贵的酒石酸 (Cofran 和 Meyer, 1970)。1g/L 延胡索酸的作用相当于 1.2g/L 酒石酸。

延胡索酸最重要的作用是能抑制苹果酸-乳酸发酵 (Ough 和 Kunkee, 1974; Pilone 等, 1974)。根据 Ough 和 Kunkee (1974) 报道,经过 12 个月的储藏,任何一种含有 1.5g/L 延胡索酸的葡萄酒,都没有发生苹果酸-乳酸发酵。然而,经过酒精发酵,延胡索酸会被降解为 L-苹果酸 (Pilone 等, 1973)。延胡索酸可用来减少细菌的起始数量,如某些乳酸菌 (见 6.6.2)。尽管我们不知道这些腐败细菌能否降解延胡索酸,但是 Pilone 等 (1973) 指出,酒明串珠菌 (酒酒球菌) 可以将延胡索酸降解为 L-苹果酸,降解机理可能与酵母菌的降解机理相同。

延胡索酸使用中的一个问题是其在葡萄酒中的溶解能力有限。事实上,酒石酸在 20℃ 水中的溶解度为 1390g/L (Anonymous, 1983),但延胡索酸微溶于水 (6.3g/L, 25℃)。然而,延胡索酸在较高温度下 (10.7g/L 40℃) 或在 95% 酒精中 (57.6g/L 30℃),溶解度会更高。Margalit (2004) 认为,可预先在热水中溶解延胡索酸 (浓度达 50~80g/L),然后趁热加入葡萄醪和葡萄酒中。

与其他具有抗菌作用的酸类物质相似,延胡索酸的使用效果受 pH 的影响。pH 越高,使用效果越差 (Doores, 1993)。另外,延胡索酸的添加会使酒呈现“粗糙感” (harsh) (Margalit, 2004)。因此,在葡萄酒中应谨慎添加延胡索酸。

5.2.5.2 乳酸链球菌素

乳酸链球菌素是一些乳酸乳球菌乳酸亚种产生的抗菌类物质 (Hurst 和 Hoover, 1993)。它的主要作用位点是细菌的质膜,能破坏细胞质膜 (Hurst 和 Hoover, 1993)。

同溶菌酶作用相似,乳酸链球菌素是革兰阳性细菌的一种有效防腐剂。Raddler (1990a; 1990b) 证实乳酸链球菌素能抑制很多乳酸菌,甚至是在很低的浓度下也能发挥抑制作用。然而该物质对酒精发酵没有影响。作者认为,乳酸链球菌素对不同菌种的抑制作用不同,其中 *L. casei* 对乳酸链球菌素是最不敏感的。Daeschel 等 (1991) 先在酒中添加乳酸链球菌素控制其他腐败菌,然后利用对乳酸链球菌素具有抗性的酒酒球菌菌株成功实现了苹果酸-乳酸发酵。其他学者认为,乳酸链球菌素能 100% 杀死不锈钢罐内的酒酒球菌 (Nel 等, 2002)。尽管乳酸链球菌素具有潜在价值,但是目前在美国乳酸链球菌素还没有被批准在葡萄酒中使用。

5.2.5.3 一氧化碳 (CO)

近年来,美国加州州立大学对 CO 的作用进行了重点研究,以替代 SO₂ 和其

他的杀菌剂、防腐剂 (Muller 等, 1996)。在实验室中, 用模拟果汁和葡萄酒为研究对象, 以一些腐败酵母为对照进行了研究。研究表明接种量在 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个/mL 的酒香酵母和汉逊酵母都能被浓度为 90mg/L 的 CO 抑制, 而抑制克勒克酵母则需 240mg/L CO。在含有 480mg/L CO 的果汁以及 7.5% 和 10% 酒精度的葡萄酒中, 拜耳接合酵母的活力被推迟 14d。与腐败酵母相比, 1000mg/L CO 对酿酒酵母属没有抑制作用。

尽管 CO 对微生物具有抑制作用, 但人们不愿使用 CO 来控制微生物。这可能是考虑到 CO 本身的毒性以及公众对使用毒性物质处理葡萄酒的顾虑。的确, CO 是一种有毒、无色、无味的气体, 并且需要专门的仪器来检测。然而, 从对人类健康潜在危险的角度看, SO_2 比 CO 毒性更强。

5.2.5.4 植物提取液

来源于红辣椒种子的一种植物提取液可作为葡萄酒中的抗菌剂。其活性成分尚不清楚, Yokotsuka 等 (2003) 把这种活性成分命名为“红辣椒种子抗菌物质”, 或缩写成 PSAS。这些研究者证实, 仅添加 16mg/L 红辣椒种子提取物, 对酿酒酵母就有很强的抑制作用。在酒精发酵过程中 PSAS 表现出很强的微生物抑制作用 (杀菌率达 100%)。

5.3 过滤

在酒窖中, 人们可以通过粗滤 (macrofiltration) 或微滤 (microfiltration) 除去固体颗粒。粗滤通过传统的硅藻土或板框过滤来实现, 而除菌过滤只能利用完整的滤膜 ($<0.45\mu\text{m}$) 来实现。其他过滤方式如超滤、反渗透等, 在一些特殊要求条件下偶尔也会使用。

在过去的 20 年里, 随着错流技术的不断发展, 过滤不仅可以除去固体颗粒, 而且常被用于分离从胶体大分子到离子等的可溶性物质。微滤作为一种最常见的过滤系统, 可以分离亚微米级的固体颗粒 ($>0.2\mu\text{m}$); 超滤则可以过滤掉更小的颗粒和胶体 ($0.001 \sim 0.2\mu\text{m}$); 而反渗透可以分离低分子质量的化合物 (如乙醇、乙酸等) 以及离子。

在葡萄酒装瓶前灭菌或窖藏时, 常使用直流过滤系统来澄清葡萄酒。在这种情况下, 果汁/葡萄酒沿着垂直的过滤器流到介质时, 固体颗粒被截留或通过介质要取决于其空隙的大小 (见图 5.4)。由于葡萄酒陈酿过程不同阶段 (窖藏或瓶装) 的要求不同, 可将过滤种类主要分为深层 (相对的) 过滤和膜过滤 (绝对的或除菌)。

同直流过滤相比, 微孔过滤、超滤和反渗透系统采用的是错流 (切向) 设计。这时, 果汁/葡萄酒持续的循环流动, 使沉积在膜表面的固体颗粒不断被清除, 以保障液体能顺利通过滤膜。

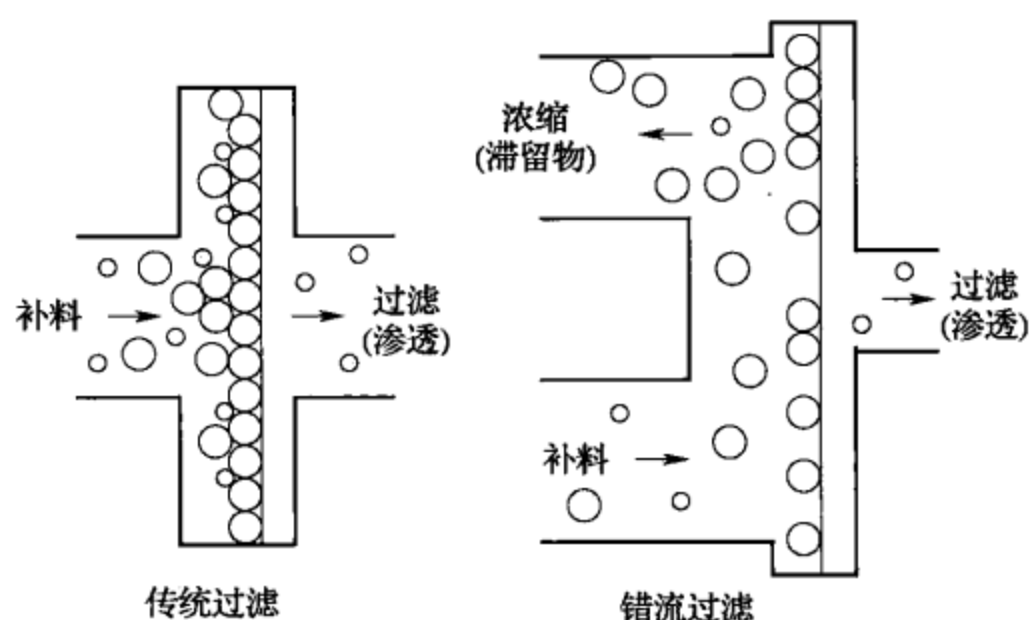


图 5.4 传统过滤（终端过滤）与错流过滤体系间的比较

5.3.1 直流过滤（深层或相对过滤）

深层过滤系统采用的是纸板，硅藻土或两种方式混合使用以除去固体颗粒。在纸板过滤过程中，固体颗粒不断地在过滤介质表面积累，有的渗入过滤基质间狭小的空间中，有的则被层间的电荷作用截留。硅藻土过滤的原理同纸板过滤的原理一样（颗粒或被排除在外或深入过滤基质中），但过滤介质需预涂在支持物上。使用后纸层和硅藻土将作为废弃物被丢弃，都不能重复使用。

因为这些介质有着一定范围的孔径和其他微小的缺陷，无法保证孔隙度或完整性。即使是所谓的除菌板也可能含有大于除菌要求的穿孔和通道。因此过滤板所说的标准速率，是与基于特定压力差（ Δp ）下穿过过滤板的批次实验室测定平均粒子滞留相关。须强调指出，通过标准纸层或系统的过滤并不能除去微生物以生产无菌葡萄酒。如果有无菌要求，过滤所用膜的最大孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 。

5.3.2 直流过滤（“绝对过滤”或“除菌过滤”）

无菌过滤就是利用多孔性膜将微生物进行机械隔离。为了除去细菌，推荐使用最大孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的膜。膜孔孔径 $< 0.45\mu\text{m}$ （如 $0.2\mu\text{m}$ ）时，流体速率普遍会下降，流速越低也就越不经济。对于膜过滤来说，腐败酵母菌是一种具有危害性的微生物（其尺寸较大），所以许多酿酒师都会选择使用孔径较大的膜（ $0.65 \sim 1.0\mu\text{m}$ ）。然而，由于微生物大小不同，当使用膜孔 $> 0.45\mu\text{m}$ 时必须格外注意。比如， $1\mu\text{m}$ 孔径过滤时，成熟的或较大的酵母细胞会被滤除掉，而较小的细胞则不会被滤掉，这样就会存在酒瓶中继续发酵的风险。换言之，孔径 $> 0.45\mu\text{m}$ 的膜不能滤除细菌。孔径的选择是复杂而困难的，Millet 和 Lonvaud - Funel（2000）指出醋菌属细胞若长期残留在葡萄酒中，会逐渐减小，从而使细菌能通过 $0.45\mu\text{m}$ 孔径的滤膜。

只要合理清洁与储存,膜过滤的过滤设备是可以重复利用的。一般彻底反冲洗膜两次便可以储存了,一次冷水一次温水,温水作用于大分子化合物(如蛋白质)使其热变性。膜储存应保持一定的湿度,大多数采用95%的食品级乙醇或柠檬酸(1200mg/L)和SO₂(600mg/L)溶液(1200mg/L)。基于上述原因,膜制造商应提供特殊的储存方法以及反冲洗的方法。

5.3.2.1 泡点

尽管可提供膜的绝对孔径,但在使用之前应对膜完整性进行核实。这要通过膜的完整性实验来实现,这种过程称之为“泡点”。气泡试验依据的原理是:使气泡通过膜孔的压力与孔径的直径或尺寸成反比。换言之,使气泡通过一个小孔径所需的压力要大于大孔径。

进行泡点试验时,膜必须保持湿润。气体,如N₂,接入过滤器的进口端,过滤器的出口端与放置在含水容器内的管子相连。气体流经过滤器腔体,利用贮气调节装置使压力逐渐上升。当气泡第一次出现在过滤器出口或者是膜朝向过滤器的一侧时,压力即为气泡点。如果所测的气泡点压力小于制造商提供的参考值,这说明膜已损坏,不能再使用该膜。膜在使用时,不论是在使用前,还是罐装结束后,以及任何使用中断之后都应该记录气泡点。

5.3.2.2 扩散试验

同临界气泡法一样,扩散试验能够评价过滤膜的完整性。在过滤膜湿润的情况下,将上端气压增加到制造商推荐的压力条件下,该压力一般为泡点压力的80%。这时,用倒置的量筒收集透过膜的气体1min。将单位时间里收集到的气体量,与透过膜的最大的扩散流速率进行比较。

5.3.2.3 潜在限制

过滤膜在去除颗粒方面(去污)的能力非常有限。澄清度差或者有明显悬浮物的酒,会很快堵塞滤膜,大大降低流速。因此,0.45μm膜仅用于对澄清度好的葡萄酒在装瓶前的微过滤。在葡萄酒不多的情况下,也可结合使用两种膜,首次穿过1μm预处理膜,再通过0.45μm的无菌膜。

任何无菌灌装,至关重要的是经过滤后的葡萄酒,在灌装前保证不再受到污染。因此,在设计和建造灌装生产线时必须注意灭菌。灭菌可以采用蒸汽或热水(>82℃)的方式来实现。考虑到最远点的热水或蒸汽源的接触时间,两种灭菌方式的时间都至少保持20min。考虑到使用大量热水所需的成本以及污染鲁氏酵母的问题,一些灌装线也采用化学灭菌,随之再利用无菌水冲洗。

5.3.3 错流/切向过滤

错流或切向过滤在酿酒和果汁/浓缩汁行业得到越来越广泛的应用。采用垂直流过滤,酒/果汁会影响到膜的垂直通透性。不同于垂直流过滤,错流过滤是将产品切向流过膜表面,其中透过膜的是滤液,而滞留物则保留在系统中。考

虑到滤膜孔径的大小，超滤膜以分子截流量来划分等级（即能够保留而不能透过滤膜的胶体物质的大约分子质量）。

在错流系统中，一般设计利用沿着膜表面所产生的湍流进行部分自我清洗，进而不断地去除颗粒。由于滤液不断地去除，新的果汁/酒不断地补加，滞留液中将最终充满悬浮物。这样一来，整个系统必须彻底清洗后才能继续运行。为了延长清洗的间隔时间，横流系统普遍采用了一套反冲洗循环系统，迫使滤液通过膜返回到过滤系统中，消除堆积的颗粒。

虽然可以去掉微小颗粒，但切向过滤还是不能替代无菌过滤。这是因为目前还没有类似于泡点试验的方法来检验整个过滤系统，所以无法确定何时膜破损或孔径足够大，以致微生物穿透滤膜。事实上，在商品化错流过滤系统获得的滤液中，检测到了 10^4 CFU/mL 的鲁氏酵母，这表明在灌装时采用无菌垂直过滤是必要的。



第 6 章 葡萄酒酿造的微生物生态学

6.1 引言

在葡萄酒酿造的不同时期，葡萄汁和葡萄酒中可检测到如第 1 至第 4 章所述的一些种属微生物。例如，在葡萄酒中可以发现酿酒酵母、酒香酵母和片球菌等（见图 6.1）。由于微生物具有广泛的多样性，酿造过程常涉及一系列微生物的变化（见图 6.2）。通常，在葡萄酒酿造中首先出现的是非酿酒酵母（见图 6.2A），接着是酿酒酵母（见图 6.2B），通常由酿酒酵母来完成酒精发酵过程。主发酵结束后，酒酒球菌或其他乳酸菌启动苹果酸 - 乳酸发酵（见图 6.2C）。在葡萄酒陈酿期间也会发现一些其他酵母和细菌，部分微生物常导致葡萄酒腐败。

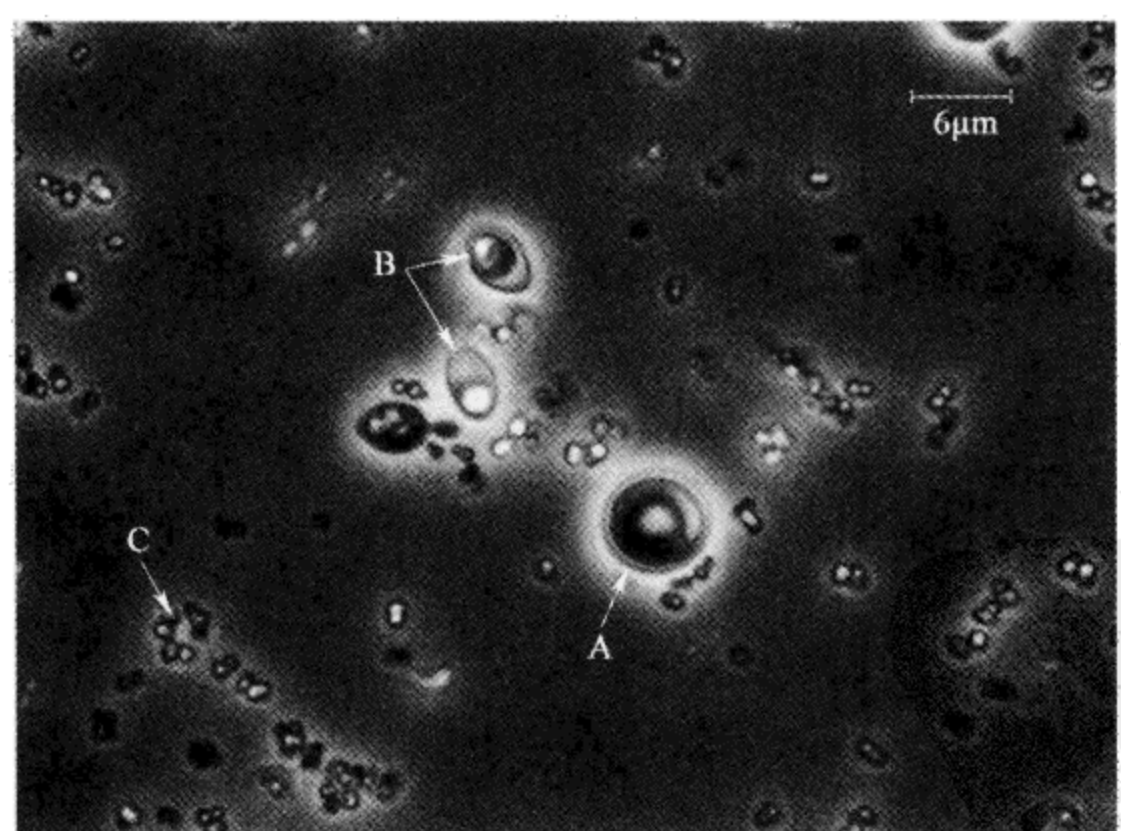


图 6.1 相差显微镜下观察到的 (A) 酿酒酵母, (B) 酒香酵母, 以及 (C) 片球菌 (放大倍数: 1000 ×, 图片由 R. Thornton 和 E. Akaboshi 提供)

在葡萄酒酿造的特定阶段，由哪种或哪类微生物占主体地位受多种因素影响，这包括原有的微生物状况、葡萄采收前状况（湿度、由于鸟类或采收造成

的损坏、杀真菌剂的使用、葡萄成熟度等)。此外,葡萄汁、葡萄醪、酒厂的清洁程度、环境卫生状况、微生物代谢产物间的相互作用等也起着十分重要的作用。

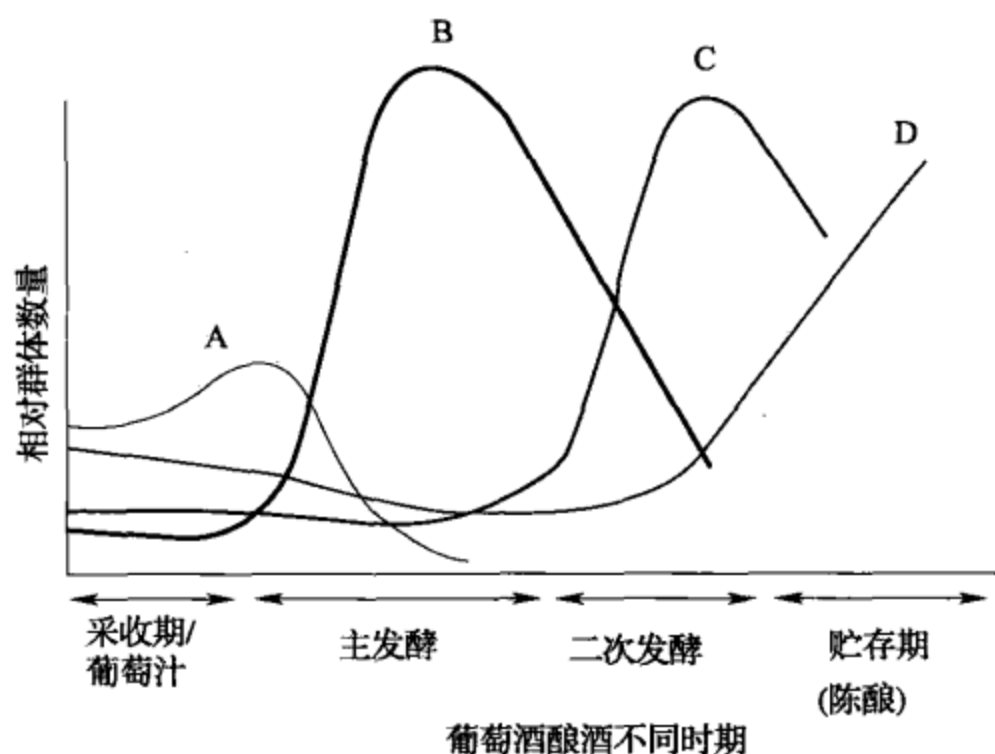


图 6.2 葡萄酒中微生物的生长曲线:(A) 非酿酒酵母;(B) 酿酒酵母;
(C) 酒类酒球菌;(D) 腐败微生物或细菌

许多证据证明微生物能够以一种“存活但无法培养 (VBNC)”状态存在,使得我们更加深入地理解葡萄酒酿造过程中的微生物生态。根据定义,处于 VBNC 状态的微生物虽不能在培养基中生长,但仍能表现出较低的代谢活性。通常,渗透压、温度、溶解氧浓度等外界压力可诱导微生物 VBNC 状态。由于葡萄酒酿造期间,可能无法检测到处于 VBNC 状态的微生物,从而在分析微生物群落动力学时会得出一些错误结论。在葡萄酒中发现的能够进入 VBNC 状态的微生物有醋化醋杆菌、酒香酵母、星形假丝酵母、植物乳杆菌、酿酒酵母和拜氏接合酵母等 (Millet 和 Lonvaud - Funel, 2000; Divol 和 Lonvaud - Funel, 2005; Du Toit 等, 2005; Oliver, 2005)。

6.2 非酿酒酵母与酿酒酵母

6.2.1 葡萄与葡萄醪

在完好无损的葡萄上,酵母数量通常能达到 $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL (Parish 和 Carroll, 1985; Fleet 和 Heard, 1993)。在葡萄浆果上分离得到的本地酵母通常是柠檬形克勒克酵母,其数量能超过酵母菌数量的一半,其他报道的数量较少的微生物有假丝酵母、隐球酵母、德巴利酵母、汉逊酵母、伊萨酵母、克鲁维酵母、梅奇酵母、毕赤酵母和红酵母 (Heard 和 Fleet, 1986; Holloway 等,

1990; Longo 等, 1991; Fleet 和 Heard, 1993; Sabate 等, 2002)。为了增加酒精产量或酿造甜型葡萄酒, 常添加葡萄汁或浓缩汁, 这时也会发现一些其他酵母菌, 如接合酵母。

在葡萄醪中也能发现酿酒酵母, 但其数量较少, 甚至在用葡萄皮渣改良过的葡萄园中, 其数量少于 50CFU/mL (Fleet 和 Heard, 1993)。从葡萄园并不能经常分离得到酿酒酵母, 这说明此类酵母喜好葡萄汁或发酵液的高糖环境。

目前, 对伊萨酵母属或梅奇酵母属微生物在葡萄或葡萄酒中的变化, 仅有少数作者对此进行了报道。虽然某些研究者报道没有分离得到东方伊萨酵母或其无性形态的克鲁斯假丝酵母 (Romano 等, 1997; Constanti 等, 1998; Mills 等, 2002; Sabate 等, 2002; van Keulen 等, 2003), 但 Guerzoni 等 (1987) 和 Clemente - Jimenez 等 (2004) 却从葡萄醪中分离得到东方伊萨酵母。Mora 和 Mulet (1991) 以及 Clemente - Jimenez 等 (2004) 发现了陆生伊萨酵母, 以前被命名为陆生毕赤酵母 (Deak 和 Beuchat, 1996)。Guerzon 和 Marchetti (1987) 从腐烂的葡萄中分离得到了克鲁斯假丝酵母、柠檬形克勒克酵母、伊萨酵母以及美极梅奇酵母。

6.2.2 酒精发酵

在葡萄破碎后的酒精发酵初期, 非酿酒酵母数量会不断增加, 直至达到最大值 (见图 6.2A)。Heard 和 Fleet (1988) 指出, 在发酵初期到中期柠檬形克勒克酵母和星形假丝酵母的数量占优, 但也可发现其他非酿酒酵母。在适宜条件下, 其菌体数量可高达 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL (Fleet 等, 1984; Heard 和 Fleet, 1988)。

虽然汉逊酵母/克勒克酵母是葡萄采收期葡萄上典型的本土微生物, 但其活性主要体现在发酵前以及酒精发酵初期。与酿酒酵母相比, 许多非酿酒酵母的酒精耐受性较低 (Deak 和 Beuchat, 1996)。因此, 酒精发酵开始后, 当酒精浓度达到 5% ~ 6% (体积分数) 时, 这类酵母会很快死亡。Heard 和 Fleet (1988) 以及 Clemente - Jimenez 等 (2004) 研究认为, 在葡萄汁中接种不同酵母, 如克勒克酵母、假丝酵母、伊萨酵母、梅奇酵母、毕赤酵母, 获得的酒精度最高不超过 6%。相反, Heard 和 Fleet (1988) 研究认为, 在共发酵中接种柠檬形克勒克酵母或星形假丝酵母 (10℃), 其数量可达到 10^7 CFU/mL, 并顺利完成发酵。与此观点相类似, Erten (2002) 观察到, 与发酵温度为 20℃ 相比, 发酵温度为 10℃ 和 15℃ 时, 柠檬形克勒克酵母的存活时间更长, 这与 Mora 和 Rossello (1992) 的研究结果一致。因此, 较低的发醇温度似乎有利于提高该类酵母的酒精耐受性, 延长生长周期 (Gao 和 Fleet, 1988)。事实上, Heard 和 Fleet (1988) 认为随着发酵温度的降低, 非酿酒酵母对葡萄酒品质的贡献更大。Egli 等 (1998) 研究表明在较低温度下发酵时, 不接种酿酒酵母的葡萄酒比接种的

葡萄酒更具有浓郁的风味。

虽然酒精耐受性是影响非酿酒酵母生长的一个重要因子，但是也存在其他影响因素。Mauricio 等（1991）研究了德尔布有孢圆酵母在酒精发酵期间的生态变化，结果表明，氧的缺乏会导致甾醇和磷脂合成不足，常引起该类酵母大量死亡。与此类似，Hansen 等（2001）认为，在同时接种有酿酒酵母的共发酵中，德尔布有孢圆酵母和耐热的克鲁维酵母的死亡并不是由毒副产物造成的，而是因为氧的缺乏引起的。近期，Nissen 和 Arneborg（2003）认为克鲁维酵母和有孢圆酵母的早期死亡不是由于营养缺乏或存在毒素造成的，而似乎是因为较高数量酿酒酵母存在时，细胞相互接触抑制引起的。在一项全面的研究中，Pina 等（2004）认为，许多因素都会影响到非酿酒酵母的酒精耐受性，如菌种、氧、其他营养因子等。

随着非酿酒酵母数量的下降，酿酒酵母逐渐占据主导地位，并完成整个酒精发酵过程（见图 6.2B）。基于这种认识，许多酿酒师都在葡萄醪中接种商业化酿酒酵母来完成发酵过程（见 8.3）。为使葡萄醪/葡萄汁中细胞数量达到一个适宜的水平，酿酒酵母的活菌体数应大于 $(1 \sim 3) \times 10^6$ CFU/mL。在酒精发酵旺盛期，其数量一般至少会达到 10^7 CFU/mL 以上。通常情况下，当细胞数量达到峰值且处于稳定生长期时，此时至少一半以上的可发酵糖已被利用。酿酒酵母会不断利用剩余的糖，主要是葡萄糖和果糖，最终酿制成干型葡萄酒（可发酵残糖 $\leq 0.2\%$ ）。

值得注意的是，酿酒酵母是嗜葡萄糖型的，即该酵母菌偏好葡萄糖胜过果糖。因此，酿酒酵母会首先利用葡萄醪中的葡萄糖，然后再利用果糖。此外果糖的甜度较葡萄糖高，这在酒精发酵停滞时可能尤为重要（见 8.5.1）。

6.2.3 发酵后期

在陈酿的葡萄酒中，也会存在德氏酒香酵母（见 11.2.2）、产膜酵母（见 11.2.3）、类酵母（见 11.2.4）和接合酵母（见 11.2.5）等，这些酵母都可能造成葡萄酒的严重腐败。

6.3 德克酵母/酒香酵母

从所有葡萄酒产区的腐败物中，都可检测到酒香酵母（van der Walt 和 van Kerken, 1959; 1961; Heresztyn, 1986; Ibeas 等, 1996; Mittrakul 等, 1999）。在霞多丽和长相思葡萄酒中感染有酒香酵母，通常在桶中陈酿的红葡萄酒也能发现该酵母。Ciani 和 Ferraro（1997）报道从起泡葡萄酒中分离到了酒香酵母。

6.3.1 葡萄和葡萄醪

尽管一些研究人员报道能从葡萄中分离到酒香酵母，但经过证实的报道却

很少。Parish 和 Carroll (1985) 从发酵的葡萄中分离到了酒香酵母,但不能确定其来源,因为葡萄是通过人工方式采收的,并且发酵也不是在无菌条件下进行的。Romano 和 Suzzi (1993) 指出能从葡萄中分离到酒香酵母,同时 Guerzoni 和 Marchetti (1987) 也报道,在含或不含 SO_2 的发酵期间,新鲜和酸败的葡萄中存在少量酒香酵母。由于 Romano 和 Suzzi (1993) 以及 Guerzoni 和 Marchetti (1987) 都没有将这些酵母鉴定到种的水平,故还不能确定这些分离出来的酵母是否能在葡萄酒中生长繁殖。Dias 等 (2003b) 曾报道在酒精发酵过程中酒香酵母能够存活,因此腐烂葡萄上的酒香酵母可能会传播到葡萄酒厂。随着基因探针等新型检测技术的发展,研究者将可能最终证实葡萄中酒香酵母的存在。

6.3.2 酒精发酵及发酵后期

尽管一般认为葡萄上没有酒香酵母,但该类微生物可以通过感染菌葡萄酒的输送、灭菌不彻底的管道、大罐或其他设备,甚至果蝇等途径传播 (Fugelsang 等, 1993; Licker 等, 1999)。由于这些酵母菌不能在成龄果蝇的胃肠道内存活 (Shihata 和 Mrak, 1951), 故另一条传播途径是通过附着于成龄果蝇体表间接传播的。虽然之前的研究中,从采自酒厂的气体样品中没有发现酒香酵母,但 Beech (1993) 指出,苹果酒暴露在空气,因酒香酵母造成酒的变质会更为明显。Connell 等 (2002) 在采自工业酒厂不同区域的气体样品中发现了酒香酵母,从而进一步验证了 Beech (1993) 的结论。

酒厂的木桶制作场所是酒香酵母最常见的生存场所。酒香酵母能够利用纤维二糖 (Blondin 等, 1982), 这种糖是在木桶生产、木板烘烤变弯过程中所产生的碳水化合物。因为与旧木桶相比,新木桶中含有更多的纤维二糖,因此是酒香酵母更好的生存场所。不易清洁的地方导致酒香酵母大量繁殖,例如在长期的生产过程中,加工设备、输送管道和阀门等处都可能过量积累有机沉淀物。另外,排水管和存放葡萄汁与葡萄酒的专门区域也是微生物生存的重要场所。

与葡萄酒中已发现的酵母相比,酒香酵母生长相当缓慢。桶中陈酿葡萄酒中酒香酵母的生长遵循钟型模式,陈酿 5 ~ 7 个月后酒香酵母密度达到最高 (Fugelsang 和 Zoecklein, 2003)。细胞数量增加至最大所需的时间受诸多因素影响,包括有效营养和可发酵糖等。Chatonnet 等 (1995) 认为葡萄酒中含量极低的残糖 (0.275g/L 葡萄糖、果糖、半乳糖和海藻糖) 就足以满足腐败酵母的生长,并且对葡萄酒的香气产生不良影响。因此即使干型葡萄酒瓶储存数月后,仍能满足酒香酵母的生长需求。

6.4 乳酸菌

6.4.1 葡萄和葡萄汁

类似于酵母，葡萄园中乳酸菌也无处不在。然而，基于乳酸菌的营养需求，其种群多样性和数量是有限的。在完好无损的葡萄果实中，乳酸菌数量小于 10^3 CFU/g，在葡萄处理的早期阶段，葡萄汁中乳酸菌的含量逐渐降低（Lafon - Lafourcade 等，1983b）。从葡萄汁中分离得到的乳酸菌有：希氏乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、酒酒球菌、肠膜明串珠菌和四联球菌（Lonvaud - Funel 等，1991）。葡萄腐败后，大量的微生物就会繁殖。本土细菌数量的增加是由于增加了有效营养（由葡萄腐败所引起），还是其他与染菌有关的因素所致，目前还没有定论。除葡萄外，研究者还从制桶厂、灭菌不彻底的泵、阀门和弯头，及灌装室的漏斗和排水管等处分离得到此类本土微生物（Donnelly, 1977）。

6.4.2 酒精及苹果酸 - 乳酸发酵

葡萄破碎后，乳酸杆菌和其他乳酸菌的组成变化复杂，不同发酵时期由不同的菌种占主导地位。Costello 等（1983）通过全面系统的研究，在发酵过程的不同时期，从葡萄汁和葡萄酒中分离得到了詹氏乳杆菌、布氏乳杆菌、希氏乳杆菌、短乳杆菌、*L. cellobiosus*、植物乳杆菌、酒酒球菌（明串珠菌）和片球菌等，这项研究与其他作者的研究结果一致（Lafon - Lafourcade 等，1983b；Fleet 等，1984；Davis 等，1986a；1986b；Sierro 等，1990）。与此类似，从华盛顿州商品化葡萄酒中分离得到了一些种属的乳酸菌，其中包括明串珠菌和小片球菌（Edwards 等，1991；1993；Edwards 和 Jensen，1992）。这些研究中，在葡萄酒酿造过程不同时期取得的样品中，可分离得到不同的种属。

任何特定种属微生物的增殖及衰减都受多种因素影响，包括营养状况、pH、酒精度、酒窖温度，以及酵母和其他细菌之间的相互作用等。例如，产自气温较高地区葡萄酒的 pH 高于 3.5，这有利于乳酸菌和其他相关细菌的生长（Davis 等，1986a）。葡萄酒酿造条件的确定也具有十分重要的影响，如酵母的选择、发酵和贮酒温度、添加 SO_2 的时间、转罐、下胶和过滤等。

虽然在压榨之后，葡萄醪中的细菌种群多样性能够在短时期内迅速增加，但在一段时间内，活细胞数通常仍保持在相对较低的水平（ $<10^3 \sim 10^4$ CFU/mL）（Lonvaud - Funel 等，1991）。即使在酒精发酵前接种，酒精发酵期间绝大多数乳酸菌也会迅速死亡，使细菌数量降低至 100 CFU/mL 以下。例如，Edwards 等（1990）发现酒酒球菌的数量从 10^6 CFU/mL 降至 30 CFU/mL 以下，并且导致苹果酸 - 乳酸发酵延迟。酒精发酵完成后，酒酒球菌的数量可能会增加，这有利于苹果酸 - 乳酸发酵（见 8.6）。也有例外情况，若被某特定乳酸菌感染，则其

在酒精发酵期间也会快速增长（见 6.6.2）。

通常，葡萄酒中片球菌的生长会促使双乙酰、不良的气味或风味物质（Du Plessis 和 van Zyl, 1963b; Radler 和 Gerwarth, 1971）、生物胺（见 11.3.6）的过量产生，从而对酒的品质产生不良影响。片球菌的某些菌种也能将甘油降解为丙烯醛（见 11.3.7），丙烯醛能与花青素反应生成苦味物质，从而影响葡萄酒的口感（Davis 等, 1988; Sponholz, 1993; Du Toit 和 Pretorius, 2000）。

虽然某些片球菌的生长不利于葡萄酒的品质，但 Edwards 和 Jensen（1992）报道，从几种葡萄酒中分离到了片球菌，但葡萄酒并未腐败。与此观点类似，Edwards 等（1994）报道，小片球菌改变了未经苹果酸-乳酸发酵的赤霞珠葡萄酒风味，但葡萄酒不存在缺陷。而且 Silver 和 Leighton（1981）报道，菌种 B44-40 最初被鉴定为酒明串珠菌，现被归类于片球菌属（Kelly 等, 1989），该菌种参与了苹果酸-乳酸发酵，但并没有导致不良风味/香气的形成。综上所述，片球菌对葡萄酒品质的影响可能不是负面的，在特定条件下可能会增加一些令人愉悦的风味或香气。进一步的研究阐述了片球菌对能分离得到该类微生物葡萄酒的影响，包括葡萄酒的化学成分、香气和风味等（Costello 等, 1983; Fleet 等, 1984; Edwards 和 Jensen, 1992; Manca de Nadra 和 Strasser de Saad, 1995）。

葡萄酒中乳酸菌的出现和存活，很大程度上受到 pH 和酒精的影响（Davis 等, 1986a）。在高 pH 的葡萄酒中（ >3.5 ），乳酸菌常处于优势地位，而在较低 pH 的葡萄酒中酒球菌数量占优（Davis 等, 1986b; Henick-Kling, 1993）。在乙醇浓度达到 5%~6%（体积分数）时植物乳杆菌会停止生长，而酒精耐受性菌株 *L. casei* 和短乳杆菌可成功地诱导苹果酸-乳酸发酵（Wibowo 等, 1985; Kosseva 等, 1998）。不同菌株间存在明显差异。G-Alegría 等（2004）报道植物乳杆菌的其他菌株能耐受更高的酒精浓度（高达 13%），这进一步证实了上述观点。

与片球菌类似，多数乳酸菌被认为是腐败微生物（Lafon-Lafourcade 等, 1983b; Wibowo 等, 1985）。在瓶装葡萄酒中，这些细菌的生长常导致葡萄酒浑浊、沉淀、失光、形成不良风味、产生过量挥发酸或乳酸等（Splittstoesser 和 Stoyla, 1987）。加利福尼亚州加强葡萄酒（fortified wine）受食果糖乳杆菌感染，葡萄酒中会产生类似纤维状的污染物（见 11.3.4）。其他乳酸菌的存在也会导致葡萄酒酒精发酵停滞或延迟（见 6.6.2）。

6.4.3 发酵后期

完成酒精发酵和苹果酸-乳酸发酵后，乳酸菌仍能在葡萄酒中生长，并导致葡萄酒变质。葡萄酒通常都含有少量的阿拉伯糖、葡萄糖、果糖和海藻糖

(Liu and Davis, 1994), 这些糖能被乳酸菌等微生物代谢利用。即使在苹果酸-乳酸发酵后, 乳酸菌和/或片球菌也能生长 (见图 6.2D), 并导致葡萄酒浑浊、失光, 形成过量乙酸或挥发酸 (见 11.3.1)、丙烯醛 (见 11.3.7)、生物胺 (见 11.3.6)、双乙酰 (见 2.4.5)、氨基甲酸乙酯 (见 11.3.2), 因山梨酸代谢形成难闻的气味 (见 11.3.5), 甘露醇的生成 (见 11.3.8)、鼠臭味 (见 11.3.3)、发黏 (葡萄酒液面长黏稠的白色菌膜而变坏) (见 11.3.9), 以及酒石酸的利用 (见 11.3.10)。

6.5 醋酸菌

6.5.1 葡萄和葡萄醪

醋酸菌与葡萄密切相关, 并且通常存在于葡萄醪中。据报道, 完好无损的葡萄中醋酸菌数量为 $10^2 \sim 10^3$ 个/g, 而酸败的葡萄中乳酸菌含量高达 10^6 个/g (Sponholz, 1993)。Splittstoesser 和 Churney (1992) 报道, 产自纽约的葡萄中氧化葡萄糖酸杆菌的数量在 10^4 CFU/g 以上。在后期一项研究中, Du Toit 和 Lambrechts (2002) 报道, 通过对南非两个年份赤霞珠葡萄酒的研究发现, 醋酸菌数量处于一个较宽的范围 ($10^4 \sim 10^7$ CFU/mL)。在霉菌生长 (特别是灰葡萄孢菌) 和葡萄腐烂处, 醋酸菌的数量和种类会增加, 不仅有氧化葡萄糖酸杆菌, 还包括纹膜醋酸杆菌或巴氏醋酸菌。同时, González 等 (2005) 也报道在酸败的葡萄中氧化葡萄糖酸杆菌和纹膜醋酸杆菌是两种最主要的微生物。醋酸菌也能在酒精发酵前的低温浸渍阶段进行增殖 (见 7.4.2)。

6.5.2 酒精发酵与发酵后期

当葡萄未酸败时, 酒精发酵会快速启动, 醋酸菌数量会下降至 < 100 CFU/mL (Joyeux 等, 1984b)。同时, González 等 (2005) 也报道在酒精发酵期间, 醋酸菌的菌株多样性及数量会降低。在含有乙醇的葡萄酒中, 即使是有氧条件, 葡糖杆菌属也不能存活 (Drysdale 和 Fleet, 1989b)。

毫无疑问, 氧在很大程度上会影响醋酸菌的生长。Drysdale 和 Fleet (1989b) 报道葡萄酒中氧含量的增加非常有利于醋酸菌的生长。葡萄酒中溶解氧含量达到 50% 时, 巴氏醋杆菌能够生长, 而醋化醋杆菌则不能。然而, Joyeux 等 (1984b) 从桶底部的酒中分离得到醋酸菌, 并指出细菌能在比预期更高的厌氧环境中存活。同时, Drysdale 和 Fleet (1989b) 也报道醋化醋杆菌和巴氏醋杆菌在较低的溶氧条件下仍能存活。此外, Ribéreau-Gayon (1985) 也报道, 从正确下胶和贮存的桶装葡萄酒中发现醋化醋杆菌的活菌数大于 10^2 /mL。最近, Du Toit 等 (2005) 也发现巴氏醋杆菌在葡萄酒无氧条件下也能存活较长时间。

Millet 和 Lonvaud-Funel (2000) 提出, 醋酸菌可能是以 VBNC 状态存在于

葡萄酒中。虽然处于 VBNC 状态的醋酸菌很难在常规培养基中培养,但作者也指出,氧的短暂接触可促进它们的生长繁殖。泵的使用、传输、下胶等工艺操作都会增加葡萄酒与氧的接触机会。即使随后采用正确措施来贮存葡萄酒,这种与氧的接触仍足以刺激其快速、连续地生长繁殖。在较低的溶氧条件下,醋酸菌很可能利用了氧以外的电子受体。Du Toit 和 Lambrechts (2002) 认为很有可能是以苯醌类物质作为电子受体,如图 6.3 所述。Du Toit (2005) 认为添加活性炭可以除去葡萄酒中的多酚物质,从而影响巴氏醋杆菌的生长。

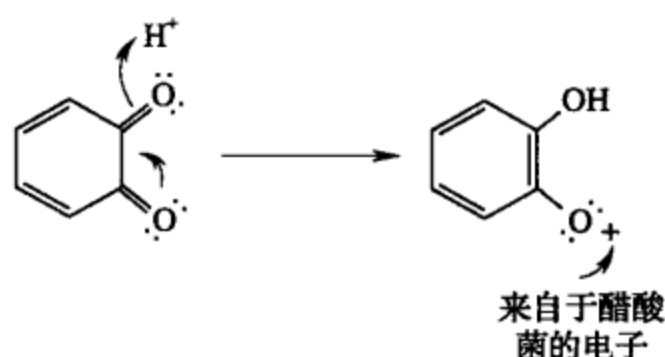


图 6.3 在溶氧低的条件下,苯醌作为电子受体的情况 (C. J. Muller, 私人交流, 1995)

在酒精发酵缓慢或停滞时,产生的 CO_2 不足以防止氧的扩散,这可能会引起醋酸菌的生长。在此条件下,醋酸菌通过直接氧化葡萄糖产生葡萄糖酸(或酯),并将乙醇氧化产生乙酸和乙醛(见 3.4.2)。某些细菌不能直接利用果糖,或一定程度上仅能利用少量的果糖(De Ley 等, 1984; Joyeux 等, 1984b)。由于酵母和醋酸菌对果糖和葡萄糖的利用不成比例,并且果糖的甜度比葡萄糖高,从而导致最后的葡萄酒中表现出“酸甜味”的特点(见 6.2.2, 7.3.1 和 8.5)。

6.6 微生物之间的相互作用

在葡萄酒的酿造过程中,不同微生物间的相互作用是影响微生物生态变化的另一个重要因素。最近 Alexandre 等 (2004) 证实了这一观点。这些相互作用导致一种或多种微生物被抑制甚至最终死亡。

6.6.1 酿酒酵母和酒酒球菌

在葡萄酒酿造过程中,酿酒酵母和酒酒球菌间可能具有相互促进作用(Lüthi 和 Vetsch, 1959; Beelman 等, 1982; Feullat 等, 1985; Guilloux - Benati-er 等, 1985), 或者会抑制细菌(Beelman 等, 1982; King 和 Beelman, 1986; Cannon 和 Pilone, 1993; Henick - Kling 和 Park, 1994; Larsen 等, 2003)。这种抑制作用已有报道,在葡萄酒中接种酒酒球菌后,活菌数会从 $10^5 \sim 10^7$ CFU/mL 很快降至几乎无法检测的程度(Fornachon, 1968; Beelman 等, 1982; Liu 和 Gallander, 1983; Ribéreau - Gayon, 1985; King 和 Beelman, 1986; Lemareshqui-

er, 1987; Wibowo 等, 1988; Semon 等, 2001)。即使酿酒酵母和酒酒球菌以大致相同浓度接种, 细菌的生存能力也会快速下降, 这在许多文献中均有报道 (见图 6.4)。

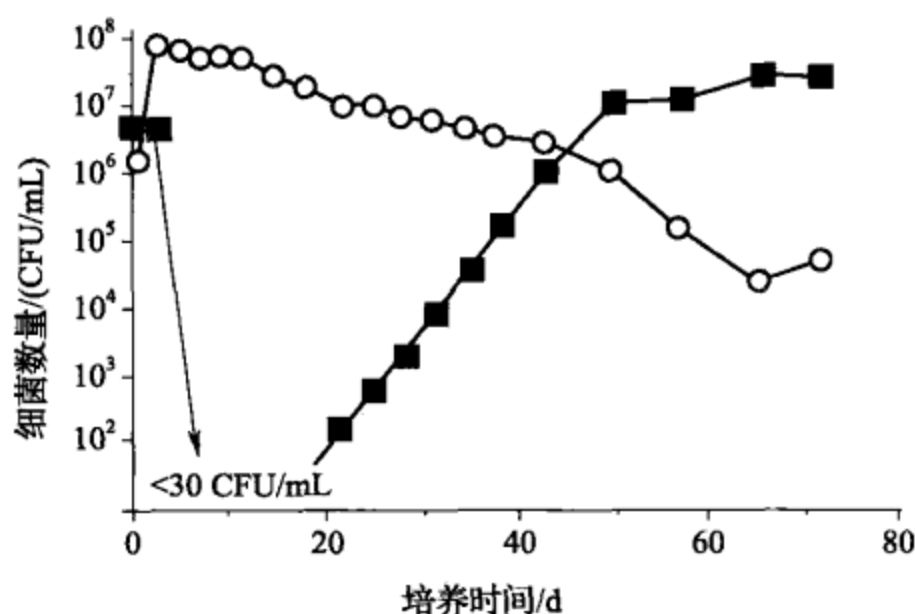


图 6.4 同时接种酿酒酵母 (○) 和酒酒球菌 (■) 后的变化 [摘自 Semon 等 (2001) 在 Australian Journal of Grape and Wine Research 上发表的文献]

有两种学说可用于解释酵母对苹果酸-乳酸菌的拮抗作用。首先, 酿酒酵母的快速生长会消耗葡萄醪中的营养 (Amerine 和 Kunkee, 1968; Fornachon, 1968; Beelman 等 1982), 而这些营养对营养需求复杂的苹果酸-乳酸菌至关重要 (Du Plessis, 1963; Garvie, 1967b)。这得到了 Beelman 等 (1982) 的证实, 他们认为在合成培养基上酵母会消耗特定氨基酸, 因此较低的浓度不足以满足细菌生长的需求。随后进一步指出, 当酵母进入稳定期、衰亡期或自溶阶段, 释放出的营养会进入葡萄酒, 从而有利于酒酒球菌的生长。据报道, 当葡萄酒在酒脚上陈酿时, 酵母菌的自溶会影响到葡萄酒中氨基酸、多肽以及蛋白质的变化 (Charpentier 和 Feuillat, 1993; Alexandre 等, 2001; Martinez - Rodriguez 等, 2001)。

最近有大量的研究证实, 酵母对营养物质的消耗并不能完全解释酒酒球菌所受到的抑制。例如, Larsen 等 (2003) 报道在酒中添加酿酒酵母 V1116 菌株发酵所耗的营养, 并不能解除细菌所受的抑制作用。在研究酵母自溶对苹果酸-乳酸发酵的影响中, Patynowski 等 (2002) 也认为酿酒酵母对营养的消耗并不是造成细菌抑制作用的原因。这项研究进而认为, 酵母所产生的未知抑制因子在葡萄酒陈酿期间会逐渐消失。由此提出了另外一种观点, 酵母产生的有毒代谢产物可能对酒酒球菌具有一定的抑制作用。

众所周知, 在酒精发酵过程中酵母菌会产生一些物质, 这些物质对苹果酸-乳酸菌具有抑制作用。如酒精 (Costello 等, 1983; Davis 等, 1986a; Britz 和 Tracey, 1990)、SO₂ (Eschenbruch, 1974; Dott 等, 1976; Eschenbruch 和 Bonish, 1976; Suzzi 等, 1985; Romano 和 Suzzi, 1993; Henick - Kling 和 Park,

1994; Larsen 等, 2003)、中链脂肪酸 (Edwards 和 Beelman, 1987; Lonvaud - Funel 等, 1988; Edwards 等, 1990; Capucho 和 San Ramao, 1994)、抗性蛋白质/短肽 (Dick 等, 1992) 等。在这些化合物中, SO_2 是最常见的细菌抑制物 (Fornachon, 1963; Henick - Kling 和 Park, 1994; Larsen 等, 2003)。对苹果酸 - 乳酸菌而言, SO_2 是一种最常用的抑制细菌的物质 (Carr 等, 1976; Liu 和 Gallander, 1983; Ough 和 Crowell, 1987; Britz 和 Tracey, 1990)。在各种 SO_2 的存在形式中, 分子态 SO_2 被认为是最具有抗菌作用的 (Macris 和 Markakis, 1974; King 等, 1981; Edinger, 1986)。Larsen 等 (2003) 推断, 在某些情况下, 高产 SO_2 的菌株能抑制苹果酸 - 乳酸发酵, 但其他酵母菌株通过其他 SO_2 产物抑制苹果酸 - 乳酸发酵。其他研究也质疑酵母产生的 SO_2 抑制细菌生长的机制 (King 和 Beelman, 1986; Lemauresquier, 1987; Wibowo 等, 1988; Eglinton 和 Henschke, 1996; Caridi 和 Corte, 1997)。例如, Wibowo 等 (1988) 发现葡萄酒中酿酒酵母会抑制酒球菌的生长, 但这种抑制作用并不是 SO_2 所致。同时, Eglinton 和 Henschke (1996) 报道酿酒酵母 AWRI 838 菌株及相关菌株所产生的 SO_2 也不会对酒中的苹果酸 - 乳酸发酵产生抑制作用。

Larsen 等 (2003) 和其他研究者证实, 酵母菌所产的 SO_2 大都以结合态存在, 而非游离态和分子态形式。这种现象似乎说明结合态 SO_2 对乳酸菌的抑制作用可能比预想的要强。然而, 关于结合态 SO_2 的某些形式 (特别是与乙醛型结合的 SO_2) 对乳酸菌是否具有抑制作用, 还存在一些相互矛盾的观点。Fornachon (1963) 早期的研究报道, 培养基中增加亚硫酸及过量的乙醛会抑制希氏乳杆菌和 *L. mesenteroides* 的生长。作者确认这些细菌能代谢与乙醛结合的 SO_2 , 并证实酒球菌具有这样的能力 (Osborne 等, 2000)。Fornachon (1963) 进一步证实结合态 SO_2 会抑制苹果酸 - 乳酸发酵, 即使游离 SO_2 含量极低时, 可能会通过代谢与乙醛结合的 SO_2 而产生游离态 SO_2 。Hood (1983) 提出一种机制来阐述这种现象, 结合态 SO_2 与游离态 SO_2 形成了一种动态平衡。然而, 这些结论与 Carr 等 (1976) 的结论相反, 他们认为与乙醛结合的 SO_2 对所研究的细菌 (植物乳杆菌) 没有影响。

Wibowo 等 (1988) 提出了另外一种理论来阐述苹果酸 - 乳酸菌的抑制机制, 他们认为酿酒酵母可能通过产生抗性蛋白质/短肽而抑制酒球菌。随后的研究中, Dick 等 (1992) 从酿酒酵母中分离得到两种对酒球菌具有抑制的蛋白质。Osborne (2005) 也分离得到一种对酒球菌具有抑制的低分子 (3 ~ 6ku) 蛋白质。Comitini 等 (2005) 在关于其他酿酒酵母的报道中也有类似的发现。

在酒精发酵期间, 酵母产生的中链脂肪酸对苹果酸 - 乳酸菌也具有抑制作用 (Lonvaud - Funel 等, 1985; Edwards 和 Beelman, 1987; Carrete 等, 2002)。据报道, 中链脂肪酸对葡萄汁和青贮饲料中的酿酒酵母和某些乳酸菌具有抑制作用 (Pederson 等, 1961; Woolford, 1975)。尽管这种假设还未获得最终证实,

但 Lonvaud - Funel 等 (1985)、Edwards 和 Beelman (1987) 报道癸酸对苹果酸-乳酸菌的生长具有抑制作用。例如, Edwards 和 Beelman (1987) 指出, 10mg/L 癸酸对酒酒球菌 PSU-1 的生长具有抑制作用, 并且很多葡萄酒中癸酸的含量都能达到这一浓度 (Houtman 等, 1980b)。此外 Carrete 等 (2002) 报道, 癸酸与低 pH 或乙醇具有协同作用, 可共同抑制酒酒球菌。然而 Edwards 等 (1990) 也发现, 若葡萄酒中癸酸或其他中链脂肪酸达 5mg/L, 则苹果酸-乳酸发酵的速度将快于含量更低的葡萄酒。

6.6.2 酿酒酵母和乳杆菌

某些酿酒师也发现延滞发酵常伴随着某些微生物的快速生长, 如生存能力强的乳杆菌 (Boulton 等, 1996)。酿酒过程中, 这种腐败微生物的大量繁殖常导致酒精发酵提前停滞。这种情况下乙酸含量特别高, 通常达 0.8 ~ 1.5g/L, 偶尔甚至达 2 ~ 3g/L。然而, 人们并不清楚该类细菌的生长与酒精发酵停滞之间的因果关系。但可以确信的是并非所有种属与上述问题相关, Edwards 等 (1993) 报道接种不同的乳杆菌并未导致酒精发酵停滞。

在其他食品中也曾发现乳杆菌对酵母具有抑制作用 (Barbour 和 Priest, 1988; Essia Ngang 等, 1990; Leroi 和 Pidoux, 1993), 但 Huang 等 (1996) 的报道首次证实了乳杆菌对酿酒酵母的抑制作用。在他们的研究中, 在实验室规模下由酿酒酵母菌 Epernay 2 完成霞多丽葡萄酒的酒精发酵, 早期接种菌株 YH-15、YH-24 和 YH-37 会对酿酒酵母产生抑制作用。如图 6.5 所示, 菌株 YH-15 能在 48h 内达到 10^9 CFU/mL 以上, 并且严重影响葡萄酒的成分 (见表 6.1)。与未接种细菌的对照相比, YH-15 的生长会使葡萄酒的 pH 下降 (3.30 和 3.75), 使滴定酸 (1.52g/100mL 和 0.51g/100mL) 和挥发酸 (1.52g/100mL 和 0.51g/100mL) 的含量上升。同时, 接种 YH-15 后, 酒精得率也显著下降。

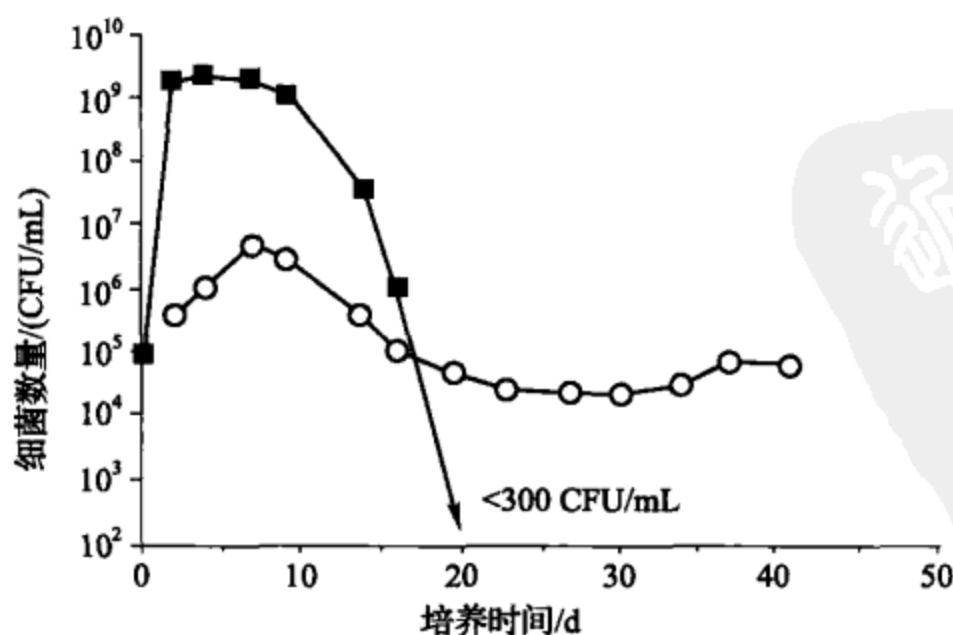


图 6.5 白葡萄汁中酿酒酵母 (○) 和乳杆菌 YH-15 (■) 的生长情况

[摘自 Huang 等 (1996) 在 American Journal of Enology and Viticulture 中的报道]

表 6.1 霞多丽葡萄酒中各成分的变化（接种的酵母菌包括 Prise de Mousse 和 Epernay，细菌包括酒酒球菌 YH-24 和 YH-37，以及被命名为 *L. kunkeei* 的菌株 YH-15）*

酵母菌株	对照	YH-24	YH-37	YH-15
Prise de Mousse				
pH	3.75 ^c	3.98 ^a	3.95 ^b	3.30 ^d
可滴定酸含量/（g/100mL）	0.51 ^b	0.35 ^d	0.36 ^c	1.52 ^a
挥发酸含量/（g/100mL）	0.025 ^c	0.037 ^b	0.038 ^b	0.31 ^a
乙醇含量/（%，体积分数）	13.2 ^b	13.6 ^a	13.5 ^a	10.4 ^c
Epernay				
pH	3.81 ^c	4.07 ^a	4.04 ^a	3.38 ^d
可滴定酸含量/（g/100mL）	0.48 ^b	0.37 ^c	0.37 ^c	1.39 ^a
挥发酸含量/（g/100mL）	0.037 ^c	0.054 ^b	0.055 ^b	0.29 ^a
乙醇含量/（%，体积分数）	13.4 ^a	13.2 ^a	13.3 ^a	10.7 ^b

注：* 在接种酵母前两天接种细菌；用不同字母表示不同菌株间的差异性（ $p < 0.05$ ）；
摘自 Huang 等（1996）在 American Journal of Enology and viticulture 的报道。

细菌 YH-24、YH-37 和 YH-15 最初是从商业化的葡萄酒中分离得到的，前两种被鉴定为野生型的酒酒球菌（Edwards 等，1998b），YH-15 是一个新种，后来被定名为 *Lactobacillus kunkeei*（Edwards 等，1998a）。近期发现乳杆菌的另外一个新种对酵母菌也具有抑制作用，并命名为 *L. nagelii*（Edwards 等）。此外，其他乳杆菌对酵母也具有抑制作用，其中包括葡萄酒中常见的两株 *L. vermiforme* 和 *L. hilgardii*（Mills，2001）。

报道了乳杆菌（包括产物乙酸）抑制酵母的多种机制。Boulton 等（1996）指出抑制作用强的乳杆菌在 2~3d 内产生的乙酸就足以抑制酵母的代谢。众所周知，乙酸对酵母具有抑制作用（Doores，1993），并且对生长和发酵均有影响（Pampulha 和 Loureiro，1989；Ramos 和 Madeira-Lopes，1990；Kalathenos 等，1995）。同样，Rasmussen 等（1995）报道在葡萄汁发酵过程中添加 4g/L 乙酸会使发酵速度下降。抑制酵母的机制一部分可能是由于乙酸的生成所致（Edwards 等，1999a），但也可能存在其他未知机制（Mills，2001）。

为控制乳杆菌的感染，处理的方法包括添加 SO₂，低温贮藏和调节葡萄醪 pH。其中，*L. kunkeei* 对 SO₂ 非常敏感（Edwards 等，1999b）。此外，乳杆菌等革兰阳性菌对溶菌酶也非常敏感。

6.6.3 酒酒球菌、片球菌和乳杆菌

苹果酸-乳酸发酵使葡萄酒的 pH 增加，从而有利于片球菌等乳酸菌的生长（Davis 等，1986a）。然而，Edwards 等（1994）发现在经过苹果酸-乳酸发酵的赤霞珠和梅鹿辄葡萄酒中，酒酒球菌对片球菌具有一定的抗性（见图 6.6）。在

接种后的短时期内，所有菌株的活菌数从最初 10^5 降至 $<300 \sim 10^4$ CFU/mL。其下降幅度受片球菌不同菌株的影响。例如，WS-29A 在两种葡萄酒中的下降幅度为 1 个数量级，而在经过苹果酸-乳酸发酵的赤霞珠葡萄酒中未检测到 C5 的生长 (<300 CFU/mL)。在经过苹果酸-乳酸发酵的葡萄酒中接种小片球菌后，其活菌数会下降，这种现象说明苹果酸-乳酸发酵赋予葡萄酒一定的微生物稳定性。然而这种“稳定性”并不持久，大部分菌株能克服这种最初的抑制作用，最终使数量达到甚至超过 10^6 CFU/mL。近期，Walling 等 (2005) 提出经苹果酸-乳酸发酵后的葡萄酒对片球菌具有更强的抗性。

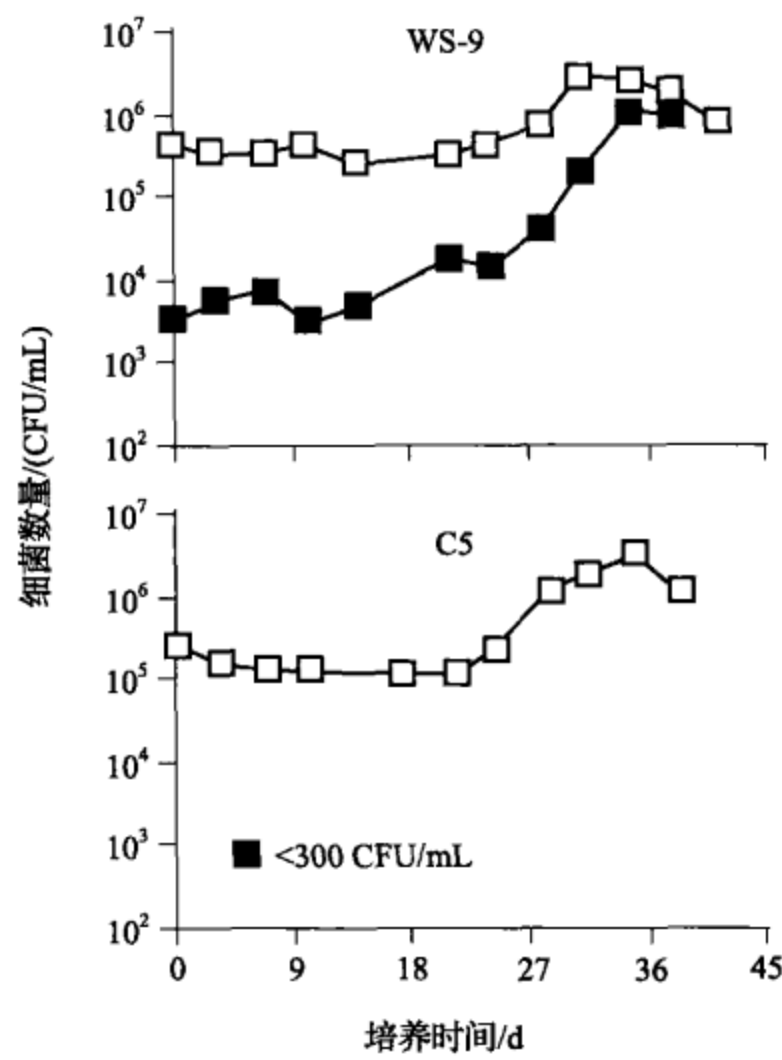


图 6.6 未经苹果酸-乳酸发酵 (□) 和完成二次发酵 (■) 的梅鹿辄葡萄酒中片球菌WS-9和 C5 的生长情况 [摘自 Edwards 等 (1994) 在 American Journal of Enology and Viticulture 中的报道]

也有一些其他报道，详细阐述了葡萄酒中乳酸菌之间复杂的相互作用。虽然酒酒球菌能够抑制片球菌 (Edwards 等, 1994)，但 Davis 等 (1986a) 提出经过苹果酸-乳酸发酵的澳大利亚葡萄酒中，小片球菌对酒酒球菌具有抑制作用。另外，Lonvaud-Funel 和 Joyeux (1993) 发现植物乳杆菌和戊糖片球菌对酒酒球菌具有强烈的抑制作用。作者提出假说，认为这种抑制作用是小分子物质不断积累的结果，特别是一些短肽和蛋白质。在其他研究中，混合培养基中 *L. hilgardii* 代谢产生的 H_2O_2 足以抑制酒酒球菌和戊糖片球菌的生长 (Rodriguez 和 Manca de Nadra, 1995a; 1995b)。

众所周知, 乳酸菌中许多种属能够产生被称作细菌素的抗菌蛋白质 (De Vuyst 和 Vandamme, 1994; Jack 等, 1994; Nes 等, 1996)。许多研究者也报道葡萄酒中存在细菌代谢形成的细菌素。例如, Navarro 等 (2000) 从产自西班牙里奥哈的红葡萄酒中分离得到 9 株具有抗菌活性的植物乳杆菌。另外, Yurdugul 和 Bozoglu (2002) 从葡萄酒中分离鉴定得到一株肠膜状明串珠菌乳脂亚种 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris*, 此菌株能够产生类似细菌素的物质。同时, Strasser de Saad 和 Manca de Nadra (1993) 分离得到两株戊糖片球菌, 能产生抑制乳杆菌、酒球菌和片球菌菌株的物质。

基于对亚健康的关注, 可通过使用细菌素来降低 SO_2 的用量。因此, 利用细菌素作为防腐剂引起了研究者的极大兴趣。例如 Schoeman 等 (1999) 通过对乳酸片球菌中 *pedA* 基因在酿酒酵母中的表达, 构建了抗菌酵母菌株, 并指出这种抗菌酵母菌株可用来抑制腐败细菌的生长。最近的研究中, Nel 等 (2002) 和 Bauer 等 (2003) 应用不同的细菌素来控制苹果酸-乳酸发酵, 并抑制酒球菌菌膜的形成。

6.6.4 其他的相互作用

众所周知, 酵母能产生并分泌一种嗜杀因子, 它能抑制其他酵母的生长 (Jacobs 和 van Vuuren, 1991; van Vuuren 和 Jacobs, 1992; Shimizu, 1993)。这种因子是蛋白质或糖蛋白, 对敏感酵母具有致死作用。酵母菌普遍具有产嗜杀因子的能力, 包括酿酒酵母、汉逊酵母、毕赤酵母、克鲁维酵母、假丝酵母、克勒克酵母、汉森酵母、红酵母、毛孢子菌、德巴利酵母和隐球酵母 (Shimizu, 1993)。Radler 等 (1985) 证实葡萄汁有孢汉逊酵母能产生嗜杀因子, 并作用于酿酒酵母的敏感菌株。近期, Comitini 等 (2004) 发现两株非酿酒酵母能抑制其他酵母, 包括酒香酵母/德克酵母等。同时, 异常毕赤酵母和 *Kluyvermyces wickerhamii* 能生产不同分子质量的嗜杀毒素, 并可稳定存在于葡萄酒中达 10d 之久。由于酒中这些毒素具有一定的稳定性, 所以在葡萄酒陈酿过程中可作为真菌抑制剂使用。最后, Gerbaux 等 (2002) 提出苹果酸-乳酸发酵可抑制酒香酵母的生长, 但还没有确切数据来支持这一观点, 还需进一步深入研究。

在早期的报道中, Gilliland 和 Lacey (1964) 提出醋酸菌不仅能抑制酿酒酵母, 而且对毕赤酵母、裂殖酵母、接合酵母、假丝酵母甚至酒香酵母也有抑制作用。虽然还没有深入研究这种抑制机制, 但研究者们并未发现抑菌过程中酸度的增加, 于是认为醋酸菌在有氧条件下会产生某种抗生素。虽然 Drysdale 和 Fleet (1989a) 报道醋酸菌的存在对酵母菌的生长能产生细微的影响, 但导致酒精发酵延滞的醋酸菌的活性还受葡萄汁和已有微生物的影响。

第7章 葡萄采收及发酵前处理

7.1 引言

微生物对葡萄酒酿造的影响起始于葡萄园，并贯穿于葡萄酒发酵、贮存或陈酿等整个环节。运输到酒厂的葡萄不仅反映了采收时葡萄的品质，而且也反映了葡萄采收的方式及运输的时间。外观完好无损的葡萄上有许多微生物，如酵母（见 6.2.1）、霉菌（见 4.2）和细菌（见 6.4.1 和 6.5.1），因此需要采取合适的处理方式，尽量限制不良本土微生物的繁殖。

7.2 采收与运输

由于破裂的葡萄及其葡萄汁中，酶的活性和微生物的增殖均难以控制，因此应采用一种合适的方式采收成熟的葡萄，最大限度减少葡萄的机械损伤。温度是重要的影响因素，葡萄园早上和晚上气温较低，因此在上述时段采收葡萄有利于提高葡萄的品质。Ough 和 Amerine（1966）指出，在货车运输过程中，葡萄的温度会明显升高，从而导致酶促褐变及微生物生长。

应尽可能缩短葡萄运送到酒厂的时间。虽然广泛使用机械化采收设备，可减少葡萄的采收成本，但如果葡萄采收和处理间隔时间过长，会对葡萄品质造成不利影响。不经常清洗采收设备，往往会带来一些问题，尤其葡萄运输到酒厂的时间延长时，该问题表现得更为突出。在运输过程中，添加 SO_2 能最大限度减少机械采收引起的葡萄变质（见 5.2.1）。

7.3 葡萄质量评估

葡萄种植户与酒厂签订的协议中，写明了完整的标准，用于判定收获季节采收的葡萄质量。在协议中，对葡萄中含糖量（可溶性固形物）、pH、滴定酸、腐败微生物等所应达到的水平做了详细的规定。同时也应考虑其他方面，包括 MOG（materials - other - than - grape）水平和生理胁迫水平（如起皱或变色）等。最重要的是，种植户与酒厂对常用标准和分析方法应保持

一致。

7.3.1 可溶性固形物

大多数水果中的糖类物质以蔗糖为主，而葡萄则不同。葡萄中主要以葡萄糖和果糖为主，蔗糖含量少。蔗糖在葡萄中的含量仅有0.2%~1%（质量分数）（Hawker等，1976）。因为酿酒酵母在胞外分泌一种转化酶，能将蔗糖水解生成葡萄糖和果糖，所以蔗糖属于可发酵糖（Goldstein和Lampen，1975）。

Margalit（2004）提出葡萄的最佳采收时间是糖度达到19~23°Bx（白葡萄）和21~24°Bx（红葡萄）。然而，美国酿酒师通常要求获得生理更成熟、风味更浓郁的葡萄（例如优良的单宁结构）。在葡萄晚收获或被灰葡萄孢霉侵染的情况下，果实中可发酵糖的含量会更高，甚至达到40%（质量分数）以上。

虽然随葡萄成熟度的不同，葡萄糖和果糖的含量会发生变化，但这两种糖的比例通常接近于1:1（Amerine等，1972）。在葡萄酒发酵期间，酿酒酵母消耗的葡萄糖大约是果糖的5倍（Dittrich，1977）。在发酵初期，葡萄糖和果糖的比例大约是0.95；在发酵近结束时，该比例大约是0.25（Peynaud，1984）。Berthels等（2004）报道，17株酿酒酵母利用糖的方式相似。研究表明，酿酒酵母嗜葡萄糖，与果糖相比，优先利用葡萄糖。究其原因，可能是因为发酵后期细胞运输果糖的能力受限（Schütz和Gafner，1995）。对酿酒师而言，除了果糖比葡萄糖甜度更高外，注重葡萄糖和果糖的利用方式，其实际应用价值不大（Godshall，1997）。当酿酒师可利用该特点来生产甜型葡萄酒时，可通过发酵停滞使葡萄酒表现出异常的甜味。

除了六碳单糖（葡萄糖和果糖）和含有12个碳的二糖（蔗糖），葡萄汁还含有五碳糖（戊糖）。在五碳糖中，阿拉伯糖最高，也可检测到鼠李糖、木糖和核糖（Esau，1967；Franta等，1986）。据Amerin等（1972）报道，葡萄汁中五碳糖的浓度范围是0.8~2g/L。虽然酿酒酵母不能代谢戊糖，但其他酵母（如酒香酵母）、霉菌和细菌（如某些乳酸菌）却能代谢戊糖。因此，酒精发酵后，戊糖可作为腐败微生物生长的碳源。

7.3.2 pH和可滴定酸

葡萄汁和葡萄酒中的pH对酵母和细菌的生长至关重要。不同种属微生物的生长速率不同，具有感官特征的重要代谢产物也不相同。随着pH的降低并接近3.0时，酿酒酵母的生长速率与发酵速率减缓，同时会增加发酵延迟或停滞的风险。Kudo等（1998）发现葡萄汁中 K^+ 和 H^+ 的相对浓度对顺利进行酒精发酵至关重要， K^+/H^+ 最低须达到25:1。在pH低于3.5时，许多乳酸菌不能很好地生长，而霉菌却能够在非常低的pH（2.0）下生长。若葡萄汁中酸度不足，通

常会通过添加酒石酸来增酸。

要确定葡萄采收的最佳 pH 和滴定酸，具有不确定性和较大的难度。如果葡萄汁酸度不足，通常采用添加酒石酸来增酸。为校正葡萄汁的酸度，所需添加的酒石酸数量受滴定酸、pH 以及葡萄汁缓冲能力的影响。当 pH 在 3.6 ± 0.3 的范围内，按 1g/L 的比例添加酒石酸，依据葡萄汁的缓冲能力，pH 可降低 0.1 ± 0.03 (Margalit, 2004)。虽然苹果酸或柠檬酸也能用于降酸，但添加量为 1g/L 时，pH 下降的幅度要略小，为 0.08 ± 0.02 。添加柠檬酸要格外小心，因为酒精发酵完成后，潜在的细菌会将柠檬酸降解为双乙酰（见 2.4.5）。葡萄汁或葡萄酒的 pH 对各种抑菌剂的使用效果也具有十分重要的影响，如 SO_2 （见 5.2.1）、山梨酸（见 5.2.4）和反丁烯二酸（见 5.2.5.1）。

7.3.3 微生物腐败

因为霉菌的孢子无处不在，利用杀真菌剂控制葡萄园中孢子萌发和生长仅能解决部分问题。例如，葡萄果实的内在特性及栽培管理方式对增加或降低霉菌的感染也至关重要。对于果穗紧凑的品种，果粒间相互挤压会破坏其表面的蜡质层 (Rosenquist 和 Morrison, 1989)，因此，在破损之处，极大地增加了微生物侵染的机会。果皮薄的品种似乎比果皮厚的品种更易受到葡萄孢霉的侵染。树冠层致密不利于空气流通和光照，易形成相对潮湿的微环境，从而增加霉菌生长的可能。开放式的树冠不仅能促进空气流通，而且可提高喷雾效果 (English 等, 1990)。4.1 至 4.5 介绍了不同种属霉菌造成的侵染。

对运送至酒厂的葡萄，为了解其微生物侵染的程度，最常采用的方式是：将完整和破损的葡萄挑选出来，分别称重，并计算不同组分含量及重量百分比。有时受微生物侵染的葡萄不易被发现，但却能检测出不良气味。同时，也发展了其他一些方法来客观评价葡萄被微生物侵染的程度。利用高效液相色谱 (Kupina, 1984) 或其他方法，定量分析霉菌（甘油和/或漆酶）、细菌（乙酸）和酵母（乙醇）产生的关键性代谢产物。

由于很难将色谱技术应用于葡萄汁的常规分析，所以开发出了一些其他方法来评价霉菌对葡萄的损坏程度。最近，Marois 等 (1993) 和 Dewey 等 (2000; 2005) 开发出一种免疫测定技术，可定量分析灰葡萄孢霉的侵染程度。利用这种免疫测定技术，Marois 等 (1993) 认为，至少应选取两个手工采收的葡萄样品和一个机械收割的样品进行测定。由于许多真菌都产漆酶 (Mayer and Harel, 1979)，所以可利用漆酶的活性来定量分析霉菌或葡萄破损的程度 (Dubourdieu 等, 1984)。Dubourdieu 等 (1984) 所建立的比色法原理是漆酶能将丁香醛连氮氧化成相应的有色醌，目前已广泛应用于该领域的分析检测。

7.4 葡萄汁的处理

在葡萄酒酿造过程中,加强管理到达酒厂的葡萄是质量控制的关键点之一。在这一时期,采取的某些措施可能会促进某些微生物的繁殖,或抑制其他一些微生物的生长,从而增加或减少发酵过程中存在的问题。如前所述(见第6章),运输至酒厂的葡萄含有多种微生物,但有时可通过改变处理葡萄汁时的内在(如固体悬浮物或使用 SO_2) 或外在(温度或限制氧)条件来控制其变化。

7.4.1 酶

在葡萄酒和果汁工业中,在发酵前使用酶制剂进行处理已具有相当长的历史(van Rensburg 和 Pretorius, 2000)。最早应用的商业化酶制剂是果胶酶,它能够分解果胶。多糖(如果胶)不利于果汁的浸出,在发酵前使用传统的果胶酶可降解多糖,从而有利于提高果汁的得率。这些酶制剂能促进果皮内色素(红葡萄酒)和风味物质的浸出,同时也可降低发酵后期葡萄酒不稳定的可能性。新型酶制剂还具有其他活性,如能够降解纤维素,促进细胞壁的破裂。

除了用于发酵前处理的澄清,酶也逐渐应用于发酵后处理,如增加葡萄酒的香气,提高蛋白质稳定性(尤其是白葡萄酒),降解 β -葡聚糖等。能增加香气和风味的酶(最常见的是 β -葡萄糖苷酶)能够提高雷司令白葡萄酒和Gewürtz-traminer葡萄酒的品种特性(见1.5.4)。蛋白质水解酶能水解蛋白质的肽键,减少成品葡萄酒中的浑浊现象,但还未发现在葡萄酒环境中活性不受抑制的酶(van Rensburg 和 Pretorius, 2000)。多糖(β -葡聚糖)的不稳定性与葡萄中霉菌的生长密切相关,它会影响葡萄酒澄清及其稳定性。为减少该类问题, β -葡聚糖酶可直接或作为浸渍用酶制剂的组成部分,在发酵前或发酵后添加使用。

7.4.2 固体悬浮物

在现代白葡萄酒酿造技术中,在发酵前往往要降低悬浮物(不可溶的)固体含量。基于上述考虑,应尽量保持和体现葡萄及其品种特性,同时要避免形成能影响葡萄酒品质的挥发性物质。例如,Crowell 和 Guymon (1963) 确认,与利用澄清葡萄醪生产的葡萄酒相比,浑浊葡萄醪生产的葡萄酒含有更高浓度的杂醇油,尤其是异丁醇和异戊醇。作者进一步指出,添加其他惰性固体如纤维素或淀粉,会增加高级醇的含量。Houtman 等(1980a)报道,在发酵期间添加1%~2%的酒脚可促进酯类物质的形成,而添加量大于5%时,则会降低酯类物

质的生成。Delfini 和 Costa (1993) 报道, 不同的固形物以不同的方式影响酿酒酵母, 并影响乙酸和乙醛的形成。最后, 与离心或静置澄清后的葡萄汁相比, 利用真空过滤的葡萄汁酿造的葡萄酒, 其含有的异戊醇浓度较低 (Ferrando 等, 1998)。

然而在酒精发酵前, 也应注意葡萄醪的过度澄清问题。通常酵母在澄清度过高的葡萄醪中不能很好地生长繁殖, 从而可能会造成发酵缓慢或停滞 (Williams 等, 1978; Edwards 等, 1990; Varela 等, 1999)。Groat 和 Ough (1978) 也发现在澄清葡萄醪中添加不同种类的固形物 (例如葡萄固形物、膨润土、滑石粉和硅藻土) 可使酒精发酵进行得更快和更彻底。根据作者的研究, 葡萄醪中固形物含量的临界值是 0.1% ~ 1.5%, 低于上述含量, 发酵缓慢。

澄清也可能改变葡萄醪中的营养成分。例如 Ayestarán 等 (1995) 发现, 未澄清葡萄醪的总含氮量高于静置或真空过滤澄清后的总氮含量。然而澄清后的葡萄醪中氨基氮含量较高。Ferrando 等 (1998) 发现不同澄清方法 (真空过滤、离心和沉淀) 对葡萄醪氨基氮和总游离氨基酸没有影响。Guitart 等 (1998) 认为一般用于前发酵过程的几种澄清剂会降低氨基酸含量, 并报道酶处理、冷冻澄清、膨润土吸附和离心后, 再添加硅胶降低了氨基酸的浓度。据报道, 葡萄破碎后添加果胶酶对氨基酸成分也有一定影响 (Hernandez - Orte 等, 1998)。

除了能改变可利用氮, 澄清也能降低其他营养物质的含量, 如甾醇。甾醇是酵母细胞膜保持完整的必要成分。有关葡萄醪中脂肪酸成分的变化也有报道 (Varela 等, 1999)。然而, 澄清的影响主要是因为去除了悬浮物中吸附的 O_2 。Crowell 和 Guymon (1963) 报道, 在发酵前对葡萄醪中的固形物进行脱气处理可以降低杂醇油的产生, 说明少量不溶性固形物能够吸附 O_2 。

澄清可用来降低非酿酒酵母的数量 (Mora 和 Mulet, 1991)。虽然在起始阶段, 其数量有一定程度的降低, 但在冷冻澄清过程中, 这些酵母能够继续生长, 菌体密度高于预期。在较低温度的发酵过程中这类酵母也具有活性 (见 6.2.2)。葡萄醪中所含的不溶性固形物也对随后的苹果酸 - 乳酸发酵产生一定的影响 (Liu 和 Gallander, 1982)。作者在该研究中指出, 固形物含量最高的葡萄酒中, 苹果酸 - 乳酸发酵的发酵速度更快。

添加或不添加澄清剂的冷却沉淀、离心或过滤等均可实现发酵前的澄清。Fleet 和 Heard (1993) 提出, 一般情况下, 离心比冷却沉淀更能有效地去除不需要的本土酵母和细菌。有报道认为, 澄清处理会影响挥发性酸的含量 (Aragon 等, 1998)。在许多澄清方法中, 冷却沉淀措施与澄清剂 (如膨润土和专利配方) 的结合使用也是一种可挑选的方法。

7.4.3 发酵前浸渍 (冷浸渍)

发酵前低温浸渍是红葡萄酒酿造的一项技术。低温浸渍有利于提高葡萄皮

中所需葡萄风味物质和色素的浸出效果。正常情况下,破碎后的葡萄醪在低温($15\sim 20^{\circ}\text{C}$)下浸渍 $12\sim 24\text{h}$,并且最多可达 $1\sim 2$ 周。在此期间,非酿酒酵母会不断繁殖,这是因为低温下,非酿酒酵母的生长能力较酿酒酵母强,从而使葡萄酒品质发生了很大变化(见6.2.2)。

有效的低温浸渍要求迅速降低葡萄温度。基于这一点,可采用的方法包括葡萄醪冷却器、干冰或液态 CO_2 等。一旦达到目标温度,就需维持温度恒定且不能任其缓慢升高。通常低温浸渍的温度比预期的要高,因此会促进有害微生物(如乳酸杆菌)的大量增殖。对酿酒厂来说,幸运的是这类细菌对 SO_2 和 pH 相对敏感(Edwards等,1999b)。根据这一建议,推荐采用的措施可增酸($\text{pH} < 3.5$),增加 SO_2 含量。若增酸不易,可添加总 SO_2 至 $50\sim 70\text{mg/L}$ 。在酒精发酵前添加溶菌酶(250mg/L),也作为一种降低革兰阳性细菌起始群体的方法(见5.2.3)。

即使将葡萄保存于低温下,其他不良的微生物(诸如乙酸菌和一些非酿酒酵母如*Kloeckera apiculata*)仍然能够生长。例如Du Toit和Lambrechts(2002)发现,温度保持 $15\sim 18^{\circ}\text{C}$, SO_2 含量为 $40\sim 50\text{mg/kg}$ 的条件下,将赤霞珠葡萄酒保存3d后,醋酸菌从 10^3 增长到 10^5CFU/mL ,且不再继续增长。然而当酒精发酵开始时,细菌则快速死亡(Du Toit和Lambrechts,2002)。

7.4.4 热浸渍酿造法

从红葡萄中提取色素的另一种技术是热浸渍酿造法。一部分葡萄被加热至 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$,并与果皮混合一定的时间(Boulton等,1996)。然后在起始酒精发酵前葡萄醪必须进行压榨。Malletroit等(1991)研究了巴氏灭菌对白葡萄汁和白葡萄酒的微生物学和感官质量的影响。作者认为酿造工业中所用的巴氏灭菌处理足以降低非酿酒酵母的数量,并且在酒精发酵前对葡萄酒的质量无不利影响。

7.4.5 惰性气体处理

依据葡萄品种、葡萄酒酿造风格和理念的不同,在发酵前使用 N_2 和 CO_2 气体清洗生产线和发酵罐并不是必需的。用惰性气体清洗降低了酿酒酵母合成细胞膜所需的生理氧浓度(见1.4.2)。对于芳香型葡萄品种(例如玫瑰香和雷司令),与氧的过分接触可能会导致不可逆的氧化,以及芳香和风味化合物的丧失(见1.5.4)。

在长期的发酵(>2 周)中,葡萄的处理以及初期的准备会影响酵母的生长。研究表明,利用无菌压缩空气进行通风发酵是有益的(Wahlstrom和Fugelsang,1988)。同样地,Valero等(2002)报道葡萄醪与氧的结合影响了发酵过程中高级醇和酯的合成。酿酒师为长期创造一种有氧的环境,常将复水活化后的启动酵母加入到葡萄汁/葡萄醪的顶部,而非直接混入罐中。

7.5 微生物腐败的水果处理

对微生物腐败的水果处理是一个棘手的问题，这不仅要去除葡萄酒和葡萄汁中因霉菌产生的气味，而且还要保证发酵和澄清的顺利进行。葡萄醪中葡萄孢霉引起的病害会导致：(a) 因漆酶引起的褐变；(b) 发酵不正常；(c) 发酵后的澄清及稳定性问题。对红葡萄品种而言，葡萄孢霉能使总花色苷降解，导致其含量显著减少 (Ewart 等, 1989)。

7.5.1 酶促褐变

白葡萄醪中酶促褐变是一个需特别关注的问题。葡萄经除梗破碎机破碎后，其氧化酶及相应的底物（多酚类物质）就会与氧接触，从而导致快速形成褐色物质 (Traverso - Rueda 和 Singleton, 1973)。氧化酶例如多酚氧化酶（酪氨酸酶）源于植物组织 (Mayer 和 Harel, 1979)，而漆酶来源于霉菌。

漆酶将氧还原形成水，并以酚类物质作为氢供体 (见图 7.1)。这类酶作用的结果就是使葡萄汁褐变，这是氧化后的酚（醌）被再次氧化后形成褐色色素及黑色素的缘故。虽然来源于葡萄孢霉的漆酶主要对二苯酚具有活性 (Dubernet 等, 1977)，但是 Mayer 和 Staples (2002) 指出某些真菌产生的漆酶也能氧化单酚。与氧化酶性质不同，漆酶受 SO_2 抑制，而在 SO_2 浓度较低时，该酶表现出一定的抗性。Somers (1984) 指出漆酶对酒精也具有一定的抗性，并报道葡萄酒贮存 12 个月后仍能检测到漆酶的活性。处理染菌葡萄常用的方法是尽量减少其与氧的接触，同时也可采用加热方法进行处理。螯合剂通过分子间的作用可去除葡萄汁中的金属离子，进而可抑制酶的活性。然而，对此还未进行深入的研究。与其他氧化酶类似，漆酶在铜离子存在下才具有活性，因此利用螯合剂可降低其他食品中的酶促褐变 (McEvily 等, 1992)。尽管利用膨润土不能完全除去酶，但利用膨润土进行葡萄汁澄清处理有利于降低漆酶的酶活性。

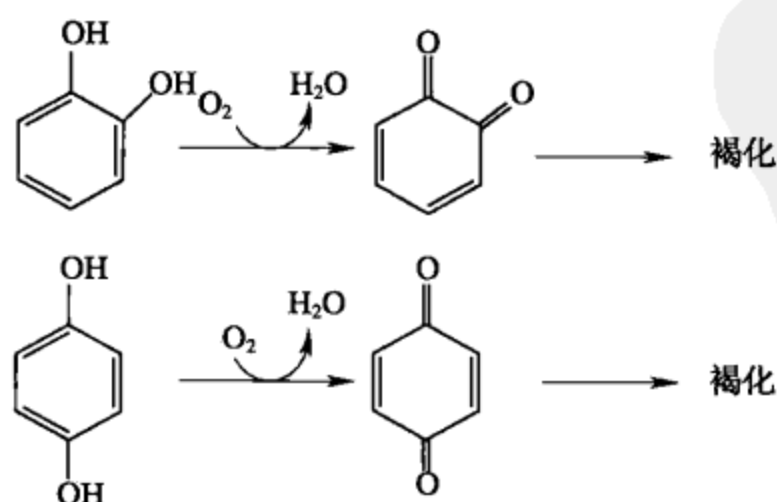


图 7.1 漆酶催化的反应

7.5.2 发酵过程中的问题

葡萄被葡萄孢霉感染后,可通过以下途径影响酒精发酵。首先,由于感染葡萄孢霉后,随着水分的不断丧失,含糖量的增加导致发酵期间酿酒酵母受到更大的渗透压。其次,葡萄孢霉可合成大量杂多糖,被称作“葡萄孢菌素”(Donèche, 1993)。发酵过程中葡萄孢菌素的存在会抑制酵母,生成更多的醋酸和甘油,其数量取决于发酵阶段。

另一个需关注的问题是受葡萄孢霉感染的葡萄的营养情况。例如,受霉菌感染的葡萄中可同化氮的含量很低(Dittrich, 1977)。Sponholz (1991)报道受葡萄孢霉感染的葡萄中氨基酸含量降低了7%~61%。Henick-Kling (1994)报道受葡萄孢霉感染的葡萄,氨基酸含量减少了1000~3500mg/L。非酿酒酵母的不断生长进一步造成了营养成分的不足。在这种情况下,Peynaud (1984)推荐添加100~200mg/L氮源,这可能还不足以使发酵达到预期水平。在美国,允许添加的氮含量较高(见8.2)。

7.5.3 澄清问题

葡萄孢霉能将葡萄糖转化为葡聚糖,由 β -D-1,3链作为葡萄糖骨架并带有短的侧链。这些葡聚糖的分子质量约为80ku(Dubourdieu等,1981),即使在很低的浓度下(10mg/L)也严重影响了澄清和过滤(Villettaz等,1984)。虽然利用澄清剂来除去这些分子的效果不佳,但利用一些商品化的葡聚糖酶来处理效果明显(Villettaz等,1984)。在葡萄汁澄清或在发酵后添加葡聚糖酶可水解这类聚合物(Dubourdieu等,1981)。发酵前添加葡聚糖酶到低温葡萄汁中所需的接触时间长,加酶量大。因此通常推荐:应在第一次转罐时添加相应的酶制剂至葡萄酒中。葡聚糖的测定方法见17.5.3。

7.5.4 管理方法

经过运输的葡萄不可避免地会有腐烂的地方。对此,建议采用改良后的传统方法进行处理。对酒厂而言,利用物理的方法去除果粒或对其进行分级是一种较为可行的方法。对受霉菌感染的红葡萄和白葡萄而言,应考虑浸渍的程度,缩短葡萄汁与葡萄皮接触的时间。

对于白葡萄品种,常进行整串压榨。在这种情况下,有必要将压榨后的前十几加仑(每吨葡萄)专门收集起来,这是因为该部分相对含有大量的霉菌代谢产物。然后分别对压榨部分的褐变程度、酚类提取物及其他损害质量的因素进行评估。葡萄醪处理好后,一些酿酒师会添加高浓度亚硫酸盐(0.8mg/L分子态 SO_2),并利用膨润土进行低温澄清处理,以期最大限度降低

微生物和酶的破坏作用。有时以 $2 \sim 4\text{lb}/1000\text{gal}$ ($0.24 \sim 0.48\text{g/L}$) 的速率添加聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP) 及硅胶来降低褐变化合物及其前体物的产生。另外一些酿酒师则喜欢在添加 SO_2 和 PVPP 前, 在低温状态下保持 24h, 将多酚氧化为聚合物或沉淀。任何情况下, $\text{pH} < 3.5$ 的酸度条件有利于抑制有害微生物的生长。

处理受葡萄孢霉侵染的红葡萄不像处理白葡萄那样简单。除了添加 SO_2 及尽量降低皮渣接触程度 (“short-vating”) 外, 通过增酸降低 pH 也能最大程度地减少褐化, 并可抑制有害微生物的生长。加热处理葡萄及葡萄汁也可用于防止有害微生物的进一步生长, 并使褐变酶 (包括漆酶) 失活。然而, 这种处理方法需要热交换器, 并造成发酵后澄清困难及葡萄酒品质的降低。

7.6 葡萄汁的贮存

未经发酵的葡萄汁可用于后期调配或其他用途, 由于存在某些耐冷或嗜冷微生物, 因此保存葡萄汁是一项富有挑战性的工作。尽管霉菌也能在葡萄汁表面生长, 但酵母菌的影响却是一个更为严重的问题。在早期报道中, Pederson 等 (1959) 发现贮存于 0°C 的葡萄汁含有酿酒酵母、汉逊酵母、圆酵母、假丝酵母等。Lawrence 等 (1959) 进一步研究发现贮存于 $-5 \sim -2^\circ\text{C}$ 的商品化葡萄汁中含有大量不同的酵母。随后, Splittstoesser (1978) 确定在贮存的葡萄汁中, 耐冷型假丝酵母占有所有酵母数量的 95%。

过滤、添加 $30 \sim 50\text{mg/L}$ SO_2 、冷藏等措施的综合运用, 可最大限度地降低贮存期间葡萄汁的氧化, 并抑制微生物的活性。由于许多非酿酒酵母对高浓度 SO_2 具有抗性, 所以仅仅使用 SO_2 不足以完全抑制酵母的生长 (见 5.2.1)。由于在高压条件下酵母受到抑制 (见表 7.1), 一些酿酒厂采用低温 ($< 2^\circ\text{C}$) 和 CO_2 [$51.3\text{lb}/\text{in}^2$ (353kPa)] 相结合的方法贮存葡萄汁。另一些酿酒师将香槟罐的气压维持在 $480 \sim 620\text{kPa}$ 来贮存葡萄汁, 也获得了成功。Delfini 等 (1995) 研究了葡萄汁及葡萄酒中极高的压力对杀死酵母和细菌的作用。山梨酸可用来抑制酵母菌的活性, 从而能提高贮存中葡萄汁的稳定性。乳酸菌能代谢酸, 形成能与酒精反应的前体, 从而赋予葡萄酒一种“天竺葵”的风味。

表 7.1 CO_2 压力对酵母活性的影响

CO_2 压力/ (lb/in^2)	酵母数量/ (个/L)
0	104
29.4	15

续表

CO ₂ 压力/ (lb/in ²)	酵母数量/ (个/L)
44. 1	11
58. 8	6
73. 5	3
88. 2	0

注：引自 Schmitthenner (1950)。
lb/in² = 6894. 76Pa



第 8 章 发酵与发酵后处理

8.1 引言

在酒精发酵过程中，酿酒酵母可将葡萄糖转化为酒精和 CO_2 。根据盖·吕萨克方程式，1 分子葡萄糖可产生 2 分子酒精和 2 分子 CO_2 （见图 8.1）。酿酒酵母产酒精的速率与许多因素有关，但每个酵母细胞在每秒钟内可产生 $(8 \sim 9) \times 10^7$ 分子酒精（Foy, 1994b）。

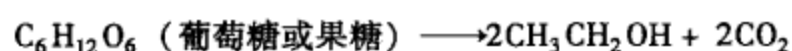


图 8.1 己糖转变成乙醇和二氧化碳的盖·吕萨克方程式

酿酒师的任务就是如何优化这些条件，促进发酵酵母（酿酒酵母）的生长，使酒精发酵更为彻底（残糖浓度小于 2g/L ），并尽量减少不良风味和气味物质的形成。从理论上说，彻底的酒精发酵和苹果酸-乳酸发酵将导致葡萄酒中的营养不足以继续维持微生物的活性（例如葡萄酒“营养匮乏”）。

8.2 葡萄醪的供应

葡萄醪中含氮化合物的浓度和组成对发酵相关微生物的营养供应和发酵后产生腐败的可能性至关重要。酿酒酵母能利用葡萄醪中绝大多数的氨基酸，但脯氨酸除外，这是由于脯氨酸在无氧条件下不能被代谢利用（Bisson, 1991）。

葡萄和葡萄醪中可用于酵母利用的氮源主要是铵盐（ NH_4^+ ）和氨基酸，这些统称为“酵母可同化氮”（yeast assimilable nitrogen, YAN）。因此，对葡萄醪的营养成分进行全面评价，需要在这两部分都进行测定。葡萄醪中总氮量不仅包括 YAN，还包括肽和蛋白质。然而，在发酵过程中肽和蛋白质并不是酿酒酵母所需的主要营养成分。

葡萄醪中 YAN 的浓度随葡萄园的不同而存在差异，影响因素包括气候、土壤类型、葡萄品种、根茎、施肥、灌溉、收割时的成熟度，以及收获前微生物降解的程度（Ough 和 Bell, 1980; Huang 和 Ough, 1989, 1991; Spayd 等, 1994）。一般而言，以最低氮源需求量（ $140 \sim 150\text{mg N/L}$ ）为指标，许多葡萄

醪中氮源含量不足。对加利福尼亚州、俄勒冈州和华盛顿州所产葡萄醪的研究结果显示，YAN 在 40 ~ 559mg N/L 范围内（见表 8.1）。Butzke（1998）对 1523 个样品进行了测定，其中 13.5% 样品中含量低于 140mg N/L。Spayd 和 Andersen - Bagge（1996）发现华盛顿州所产的样品中，有 25% 低于这一浓度。

表 8.1 从加利福尼亚州、俄勒冈州和华盛顿州获得的 1523 个样品
 葡萄醪中酵母可同化氮（YAN）的含量

	氮含量/（mg N/L）	基本氨基酸含量/（mg N/L）	YAN 含量/（mg N/L）
平均 ± SD	79 ± 35	35 ± 51	213 ± 70
范围	5 ~ 325	29 ~ 370	40 ~ 559

注：根据 Butzke（1998）在 American Journal of Enology 和 Viticulture 中的报道。

虽然尿素曾长期被用作发酵过程中添加的氮源，但由于证实它是形成氨基甲酸乙酯的前体物质，现在许多国家已禁止使用（见 11.3.2）。在一定程度上，氮源缺乏通常是添加磷酸氢二铵（27% NH_4^+ 及 73% PO_4^{3-} ）。在美国，通过添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 改善营养缺乏时，法律允许的最大添加量是 960mg/L（81lb/1000gal），这一浓度能提供 203mg/L 的可同化氮。在欧洲，国际葡萄与葡萄酒组织允许添加的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的最大量仅为 300mg/L。在澳大利亚，磷酸盐的添加也受到限制，无机磷酸盐的最大允许添加量仅为 400mg/L（Henschke 和 Jiranek，1993）。

除了添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 外，一些酿酒师提倡使用均衡的营养配方，包括氨基酸、无机盐、维生素和其他酵母生长所需的成分。因为目前美国不允许这些配方中某些成分的使用，酿酒师必须向美国酒、烟税收与贸易局提出申请，以使用未经明确许可的原料（R. Gahagan，私人交流，2005）。

虽然在接种酵母时添加无机氮源简单易行，但是这种方法也促进了非酿酒酵母的增殖。一种可替代的方法是在接种后推迟 48h（红葡萄酒发酵）和 72h（白葡萄酒发酵）添加氮源。Sablayrolles 等（1996）报道，在发酵中途或发酵开始单独添加无机氮源，效果相同。因为发酵末期酵母不能利用 NH_4^+ ，所以应避免此时添加（Beltran 等，2005）。此外，在发酵完成后，葡萄酒中过量的铵盐将有利于腐败微生物的生长。

一些酿酒师在发酵过程中添加酵母菌皮。作为商品化实验试剂行业和酿造工业的副产品，菌皮是指酵母细胞壁的残余部分。这些产物能提供部分可同化氮源和其他的营养，并且能吸收对葡萄酒中微生物有潜在毒性的中链脂肪酸分子（C8 和 C10）（Munoz 和 Ingledew，1989a，1989b；Edwards 等，1990）。因为酵母菌皮中的脂肪在暴露于空气中时可发生氧化降解，贮存时间延长时将产生腐臭味。此时，由于酵母菌皮可能影响葡萄酒的风味，故应除去。

除了氮源，酿酒师也希望通过调节葡萄醪的酸度（见 7.3.2），添加抗菌物

质如 SO_2 (见 5.2.1) 或溶菌酶 (见 5.2.3), 以及结合使用澄清剂, 来减少腐败微生物的数量 (Puig - Deu 等, 1999)。

8.3 酒精发酵

尽管葡萄醪中含有的酿酒酵母较少, 但这些酵母在合适的条件下能完成发酵过程。然而, 发酵起始所需的时间过长, 生产上难以接受, 并且发酵结果也达不到预期结果。因此, 在生产上加入酵母种子液。总之, 使用这种种子液的目的是尽快启动发酵, 形成外源菌种的数量优势, 降低腐败的可能性。

8.3.1 种子液的发展史

在商品化的活性干酵母出现之前, 酿酒师如果想利用种子液, 就必须将厂里保存的原菌种进行培养。完成这个过程, 需先将纯培养物转移至无菌葡萄醪中, 通过一系列无菌操作, 经数周时间, 扩大培养至预期发酵液体积的 1% ~ 5% (体积分数)。制备一定量未被微生物污染的种子液, 就可将其接种至葡萄醪中。由于前期准备需要大量的时间和原料, 因此在多次转移操作时保持纯培养物不被微生物污染, 具有一定难度。

由于从原菌种制作种子液来启动发酵存在一定的困难, 从 20 世纪 50 年代起, 葡萄酒专家推荐采用商业葡萄酒酵母作为种子。早期的研究指出压缩酵母具有一定的使用潜力, 这种酵母与焙烤食品工业所用的酵母相似 (Foy, 1994a)。因为这些酵母的湿度较大 (70%), 所以主要的问题是在酿酒厂使用之前容易发生腐败现象。焙烤食品工业需要全年不间断使用酵母, 但酿酒工业不同, 它在相对较短的时间里突然需要大量的酵母。1963 年将压缩酵母成功进行干燥, 解决了这一问题。两年后 Red Star Yeast 公司 (Universal Foods Corporation) 在美国销售第一批商业化的葡萄酒活性干酵母 (WADY)。据估计, 全球葡萄酒酿造地区都使用活性干酵母, 在一些地区使用的比例甚至超过 85% (Foy, 1994a)。

即使商业化产品具有诸多优点, 但基于观点与所使用种子的不同, 酿酒师们被分为以下几类。一些酿酒师在酿造中仅依赖本土酵母和细菌, 以期生产出独特的产品 (见 8.4)。一些酿酒师则乐于在酒精发酵前期接种一些非酿酒酵母, 但在后期接种酿酒酵母。还有一些酿酒师以酿酒酵母作为种子液, 但接种量低于传统水平。大多数酿酒师都使用生产商供应的活性酵母作为种子。

8.3.2 种子的制备

活性干酵母的生存能力有一定的差异, 但一般能达到 $(1.1 \sim 3.9) \times 10^{10}$ CFU/g (Foy, 1994b)。活性干酵母的湿度很低, 可以长期贮存, 但不能无限期

地存放。由于这些产品采用真空包装, Foy (1994b) 估计, 在 5℃ 贮存时发酵活力每月减少 0.5% ~ 1%, 在 21℃ 时达到 1.5% ~ 2%。如果贮存在高温下 (37℃), 仅 16 个月 WADY 就损失了 75% ~ 80% 的活性 (Foy, 1994b)。

种子制备和繁殖的方法是发酵成功的关键。虽然种子具有高的活性, 但操作中要避免将菌体颗粒简单地撒到葡萄醪表面或内部。因为这样通常会导致菌体不易分散, 形成菌丝球。此外, 聚集体内部的细胞不能完全与水结合, 产生的活性细胞数就可能低于预期数量。当然, 应根据供应商的产品说明, 将 WADY 进行复水活化。一般推荐, 在接种前, 在 37 ~ 40℃ 用水或稀释 (1:1) 的葡萄汁复水 15 ~ 20min。Monk (1986) 发现, 这些复水条件可获得近 100% 的活力, 如果在 15℃ 进行复水, 仅能获得 40% ~ 50% 的活力。

刚进行复水活化或者种子罐中生长旺盛的酵母, 都不能直接添加到冷却的葡萄醪中。通常需在接种前将酵母在 10℃ 葡萄醪中驯化一定时间。Llauradó 等 (2005) 发现, 先将酵母按照标准方法进行复水活化, 然后在较低温度下传代培养, 不仅可以避免酵母的冷休克, 而且能提高酵母的低温发酵 (13℃) 性能。另外, 由于搅拌可能会降低种子液的活力, 所以应谨慎操作。

从经济成本和时间考虑, 在种子罐中培养大批的酵母, 并在短期内用于生产, 明显优于在罐中将酵母进行逐级复水活化。在这种情况下, 必须要准备大量的无菌果汁, 以维持繁殖阶段酵母的生长, 避免污染。准备好的果汁还应先经过加热、冷却-澄清、过滤等处理, 才能用于扩培种子液, 后两种方法是酿酒厂中最常用的措施。也可以在使用前, 向澄清后的果汁中添加碳酸二甲酯进行灭菌 (见 5.2.2)。

向种子罐中加入酵母种子液后, 经过 24 ~ 72h 的繁殖, 培养液才能达到足够的细胞数量, 以 $(1 \sim 3) \times 10^6$ CFU/mL 的细胞密度, 添加到葡萄醪中进行发酵。在生长过程中, 应进行镜检, 检测酵母的活力, 估算芽殖细胞的百分数, 预防其他微生物的污染。也需要对使用中的种子罐进行密切地监测, 以确保不发生继发性污染。添加到葡萄醪中时, 生长旺盛的种子液中, 芽殖细胞应占细胞总数的 60% ~ 80%。与之相反, 刚进行复水的酵母中, 芽殖细胞的数量通常只有总细胞数的 2% ~ 5%。第 14 章介绍了监测细胞种群的过程。

一些酿酒厂尝试使用其他来源的酵母种子, 包括皮渣、发酵葡萄酒或其他几乎完全发酵的酒脚。虽然表面上来看降低了成本, 但以这些作为种子极大地增加了腐败微生物 (醋杆菌属、乳杆菌属及其他微生物) 污染的可能性。另外, 处于这一阶段的酵母缺乏长效的活性。

在重新利用酒脚和皮渣作为发酵种子时, 添加 5% ~ 10% 新鲜的无菌葡萄汁, 会降低酵母活性和微生物的污染。此外, 在半厌氧条件下连续生长, 导致细胞产生应激反应, 在限定时间内, 既不能启动发酵, 也不能完成发酵。因为营养的大量消耗会降低细胞的活力, 所以种子罐必须定期测定糖度和镜检, 并

在糖耗尽前进行转移。

使用 WADY 的一个困难是这些培养物很少是纯培养物。事实上, WADY 中可能含有一些细菌种群, 如乳酸菌, 但杂菌的数量不能高于 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g (Foy, 1994b)。

8.3.3 菌株的选择

酿酒厂或研究机构分离得到的具有优良酿酒性能的酵母菌株已实现商品化生产。目前, 几家国际公司将分离得到的数百菌株商品化后出售给酿酒厂。遗憾的是, 一些菌株的来源已经无从得知。根据 Foy (1994a) 的叙述, 20 世纪 30 年代最初由 W. V. Cruess (加利福尼亚大学, 戴维斯) 将菌株 Montrachet (UCD522) 带到美国。据推测, 此菌株来源于法国的蒙塔榭地区, 然而, 对于最初分离和培养这株菌的酿酒师或研究者却一无所知。

虽然酿酒师常常认为, 有些菌株在某些特殊用途时具有优势, 但这一观点仍存在争议。表 8.2 列出了常见葡萄酒酵母的优良特性。每个菌株具有不同的特性, 包括不同的发酵速率和 H_2S 产量 (Ough 和 Groat, 1978; Jiranek 等, 1995c)。

表 8.2 葡萄酒酵母的有益特性

起始发酵速度快
耐受低 pH 环境、 SO_2
可在低温下发酵
耐受高温
可发酵干型葡萄酒
产生令人愉悦的香气
需氮量低
H_2S 产量低
尿素产量低
产泡沫少
絮凝性好 (有助于澄清)
兼有苹果酸-乳酸发酵的特性 (如果需要)

8.3.4 温度

在发酵期间, 酵母代谢分解可利用的糖提供能量。然而, 发酵时部分能量转变成热能而损失掉。因而导致发酵活跃期葡萄醪的温度升高。根据 Margalit (2004) 的报道, 将 $23^\circ Bx$ 的葡萄醪在隔热容器中进行发酵, 理论上可使温度上

升 26.5℃。因此,发酵时温度的控制是成功的关键。

白葡萄酒通常在较低的温度进行发酵(10~18℃),这样更有利于保留香气;而红葡萄酒则在较高的温度发酵(18~29℃),有助于提高色素和单宁的浸渍(Ough 和 Amerine, 1966)。Peynaud (1984) 建议,对发酵温度稍加改变,18~20℃范围内酿造白葡萄酒和桃红葡萄酒,26~30℃范围内酿造红葡萄酒。Margalit (2004) 认为,白葡萄酒和桃红葡萄酒应在更低的温度(8~14℃)下发酵,而红葡萄酒需在22~30℃发酵。

如预期一样,酵母的发酵速率随温度的不同而变化。Ough (1964) 报道,与15℃或27℃时发酵相比,10℃时的发酵速率相对较慢。温度也会影响酿酒酵母与非酿酒酵母之间的种群平衡。红葡萄酒发酵时,采用较高的发酵温度(20~30℃),酿酒酵母是优势菌种(Sharf 和 Margalith, 1983)。白葡萄酒发酵时,温度较低,常用的非酿酒酵母就快速增殖(见6.2.2)。

8.3.5 固定化酵母

由于在发酵后存在的酵母会对澄清造成困难,所以可供选择的研究方案就是使用固定化的微生物。固定微生物时,先将酵母吸附于海藻酸钙制成的小球或纤维中,然后包裹在人工合成的筛桶内,最后浸入葡萄汁/葡萄醪中。仅有很少的酵母($<10^3/\text{mL}$)从固定化基质中脱落(Yokotsuka 等, 1993),能有效进行酒精发酵。Yajima 和 Yokotsuka (2001) 报道,利用双层微粒固定化的酿酒酵母酿造的葡萄酒中,不良挥发性化合物的浓度(甲醇、乙酸、乙醛)较低。固定化酵母也可用于起泡葡萄酒的生产(Fumi 等, 1988; Yokotsuka 等, 1997)。

8.4 “自然”发酵

利用水果和酒厂中存在的本土微生物种群来完成酒精发酵和苹果酸-乳酸发酵,这重新引起了一些酿酒师的兴趣。产品具有独特的风格是酿酒师愿意承受自然发酵风险的动力。明显的优点包括酒中化合物的复杂性和强度增加,口感更加饱满和圆润。后者说明存在少量未发酵糖和低级醇,并增加了具有感官影响的重要代谢产物的产生。

众所周知,非酿酒酵母能产生各种不同的气味和风味分子,从而改变了葡萄酒的质量(Holloway 和 Subden, 1991; Gil 等, 1996; Lema 等, 1996)。除了商业化酵母种子的延时接种之外,酿酒师一般在较低的温度下(10~15℃)进行发酵,以促进非酿酒酵母的繁殖(见6.2.2)。

筛选得到的非酿酒酵母,绝大多数都是假丝酵母、毕赤酵母、克勒克酵母、克鲁维酵母和 *Torulaspora*, 并且多位研究者已对非酿酒酵母作为商业化菌种来改

善和提高葡萄酒质量的潜力进行了分析 (Ciani 和 Maccarelli, 1998; Henschke 等, 2002; Toro 和 Vazquez, 2002; Jolly 等, 2003; Mamede 等, 2005; Sommer 等, 2005)。Jolly 等 (2003) 将铁红假丝酵母和酿酒酵母同时接种到白诗南葡萄醪中。虽然标准的化学分析揭示出不同葡萄酒之间的差异很小, 但是作者认为从味觉比较, 共培养所酿造的葡萄酒比单用酿酒酵母发酵产生的葡萄酒具有更优的品质。类似地, Henschke 等 (2002) 和 Toro、Vazquez (2002) 用两种假丝酵母 (星形假丝酵母和 *C. cantarellii*) 与酿酒酵母共培养来分别生产霞多丽酒和西拉酒。Henschke 等 (2002) 报道, 星形假丝酵母中优先代谢果糖的菌株在发酵液中的生长, 可降低葡萄酒中的残糖量, 该结果与 Toro 和 Vazquez (2002) 的发现相符。Ciani 和 Ferraro (1998) 研究时将星形假丝酵母固定到海藻酸钙小球中, 而不是直接进行接种。然而, Ciani 等 (2000) 报道, 在发酵条件下星形假丝酵母较低的生长和发酵速率, 是其商业化潜在的困难。另一种非酿酒酵母柠檬形克勒克酵母, 虽然也能提高一些葡萄酒的品质 (Mamede 等, 2005), 但会产生大量各种不同的挥发性化合物, 包括会影响葡萄酒品质的乙酸 (Ciani 和 Maccarelli, 1998; Plata 等, 2003)。最后, Sommer 等 (2005) 描述了将酿酒酵母、克鲁维酵母和 *Torulaspora* 混合后作为活性干菌粉的应用。

一些非酿酒酵母会合成各种不同的挥发性气味和风味化合物, 从而破坏葡萄酒的品质。然而, 另一个所关注的问题是这些酵母对营养的消耗。像酿酒酵母一样, 非酿酒酵母也需要各种各样的营养成分, 例如氮源、维生素和矿物质等, 它们可能在酿酒酵母开始发酵之前就消耗很多营养, 从而对酒精发酵产生潜在的不良影响。

8.5 发酵问题

8.5.1 发酵迟缓/停滞

酿酒师在葡萄酒酿造中所面对的极其重要的成本问题就是酒精发酵速率低, 特别是含糖量高的葡萄醪发酵 (Alexandre 和 Charpentier, 1998; Bisson, 1999; Bisson 和 Butzke, 2000)。酵母生长和发酵的提前停止, 导致葡萄酒中含有未发酵的糖类物质, 并且酒精浓度低于预期值 (Fleet 和 Heard, 1993)。在酒精发酵的中后期, 此现象表现为活力迟缓, 而在其他情况下, 发酵活力可能会突然中止。从商业化的角度来看, 发酵迟缓或停滞的葡萄酒, 因其具有甜味、感官品质差和潜在的微生物污染, 不被消费者认可。

发酵延缓与停滞的原因包括营养的缺乏、抑制性物质的存在、加工处理的困难以及细菌的拮抗作用 (见 6.6.2)。虽然各种不同的因素都对发酵迟缓或停滞有一定的影响, 但特定因素的具体原因还未得到证实。

8.5.1.1 营养的缺乏

众所周知，氮源的缺乏将限制酵母的生长，并减缓发酵速率（Agenbach, 1977; Ingledew 和 Kunkee, 1985; Monteiro 和 Bisson, 1992; Henschke 和 Jiranek, 1993; Jiranek 等, 1995b; Spayd 等, 1995）。Henick - Kling（1994）报道，酵母可利用 1000 mg/L 的氨基酸，Dittrich（1987）也同意这一观点。据估计，完全发酵所需的可同化氮的最低浓度是 140 ~ 150mg N/L（Agenbach 1977; Spayd 等, 1995）。很清楚，这些标准不能代表所需的绝对最低浓度。例如，Bisson 和 Butzke（2000）认为，140mg N/L 没有考虑到许多葡萄醪中的高糖浓度，并根据葡萄醪组成提出了自己的建议（见表 8.3）。但一些酿酒师还没有找到需氮量与葡萄醪中糖浓度之间的关系。例如，Wang 等（2003）报道，利用仅含有 60mg N/L 酵母可同化氮和 24% 糖浓度（干重）的合成葡萄汁培养基进行了发酵。此外，需氮量随酵母菌株而异（Ough 等, 1991; Manginot 等, 1998; Julien 等, 2000）。

表 8.3 在不同糖浓度的葡萄醪中酿酒酵母所需氮量的估算值 [Bisson 和 Butzke（2000）推荐]

葡萄的成熟度/°Bx	酵母的可同化氮含量/（mg N/L）
21	200
23	250
25	300
27	350

与细菌不同，酵母在细胞内能积累大量的氨基酸。依据特定的氨基酸、生长时期和所必需的转录酶活性，这些氨基酸或者直接合成蛋白质，或者降解作为氮源或碳源，或者贮存于液泡或细胞质中以备后续之用（Bisson, 1991）。

酵母所需的另一个重要的营养成分是氧。由于氧是固醇合成所必需的，所以开始时缺乏一定量的氧，发酵将会减缓（见 1.4.2）。由于葡萄具有氧化酶活性（见 7.5.1），未添加 SO₂ 的葡萄醪中含氧量迅速降低。用泵通风是酿酒厂向氧不足的葡萄醪中添加额外氧的方法，并且葡萄破碎后添加 SO₂ 有助于限制氧化酶的活性。

8.5.1.2 抑制性物质

已确定，葡萄醪中的高糖浓度对酵母的生长有抑制作用，并能使发酵速率减慢（Ough, 1966; Lafon - Lafourcade, 1983; Casey 等, 1984）。近来，Erasmus 等（200）观察到，酵母在 400g/L 含糖量的葡萄醪中生长时，细胞密度最大值低于 200g/L 含糖量葡萄醪中的繁殖情况。Nishino 等（1985）认为，含糖量高的葡萄醪中发酵速度较慢，是由于渗透压对酵母的影响所致。

除了乙醇，葡萄中所含的杀菌剂也会降低发酵速度。比如，Conner（1983）

分析了 25 种葡萄园使用的农用化学品, 其中 5 种对酵母就有抑制作用。然而, Pilone (1986) 发现氯苯氧基二甲乙基三唑乙醇 (Summit™) 是一种杀菌剂, 能预防白粉病和黑腐病, 并且不会影响 Montrachet UCD 522 或 Pasteur Champagne UCD 595 的酒精发酵。杀菌剂通过不同的方式影响酵母, 比如改变固醇的含量 (Doignon 和 Rozès, 1992)。

8.5.1.3 其他因素

在约 29℃ 时进行发酵, 发酵速率就会迟缓, 而在更高温度 (37℃) 时发酵, 发酵就可能完全停止 (Ough 和 Amerine, 1966)。高温瞬时的致死效应, 不仅仅只是温度自身的原因, 温度的抑制作用与低乙醇耐受性相联系。酵母对温度和乙醇的耐受性随种属或菌株而异, 而且反映了培养基内在和外在的特性。Ough 和 Amerine (1966) 也提醒, 在高温时乳杆菌的污染也是需要关注的问题。最后, 发酵前葡萄醪的过度澄清也是一个问题, 潜在地降低了营养成分, 除去了不溶性固体物质所吸附的氧 (见 7.4.2)。

8.5.1.4 二次发酵

面对发酵迟缓或停滞时, 酿酒师有多个方法可解决该问题。因为在皮渣和酒脚中腐败酵母和细菌很活跃, 所以在重新发酵之前葡萄酒应进行倒罐。出于相同的原因, 自流汁比压榨汁更适合于作为重新发酵的培养基。虽然尝试利用正在发酵的葡萄醪进行再接种, 但 Peynaud (1984) 不提倡采用这种处理方法, 并指出发酵酒与生产后期停滞的发酵液之间可能存在的酒精浓度差异, 足以刺激发酵中的酵母, 因此引起甜度提高的发酵停滞。Cavazza 等 (2004) 认为在发酵停滞的葡萄酒中恢复酵母活性的主要障碍是 SO_2 和乙醇的浓度。

虽然存在其他的技术, 但以下的建议对于重新启动停滞的发酵是很有效的 (M. Bannister, 私人交流, 1995)。从发酵停滞的葡萄酒中去除总体积 2.5% 的量, 剩余液体与等体积的水混合后, 作为再次发酵的培养基。由于停滞葡萄酒中可能存在微生物的污染 (见 6.6.2), 因此需进行无菌过滤 (0.45 μm)。添加含有磷酸氢二铵的酵母所需营养成分至建议水平。酿酒师选择使用一些商业化的酵母配方, 其中包括维生素和酵母菌皮, 后者可刺激发酵 (见 8.2)。调节糖浓度到大约 50g/L, 并预热培养基加热至 30℃, 之后按 2 ~ 4lb/gal (0.24 ~ 0.48g/L) 的比例进行接种。根据生产商的说明书, 将酵母进行复水活化 (见 8.3.2)。一旦接种, 在几个小时内将培养基的温度缓慢降至 20 ~ 22℃。当重新启动发酵的培养基中糖度大约下降一半时, 额外添加 20% (体积分数) 无菌过滤的停滞葡萄酒。此后, 每当糖度下降一半, 就按 20% 的比例进行添加, 直至停滞葡萄酒耗尽。这一过程可能需要几个星期, 在此期间必须防止苹果酸-乳酸发酵。

Bisson 和 Butzke (2000) 归纳了另一种用于二次发酵的相似的方法。他们建议, 将停滞葡萄酒进行压榨或粗过滤, 添加 30mg/L 总 SO_2 , 并且调节温度至

20~22℃。将15L水(20~22℃)与3000g浓缩葡萄汁(65°Bx)、30g磷酸氢二铵混合,制得1000L停滞葡萄酒的二次发酵培养基。1kg贝酵母在5L水(38~41℃)中再复水活化15~20min。在30min内,将二次发酵培养基逐步地加入酵母种子液中,然后开始发酵直至代谢消耗掉一半的糖源(仅需几个小时)。此时,加入等体积的停滞葡萄酒,使二次发酵培养基总体积加倍。按每分钟10%罐体积的速率,以泵或鼓泡方式通入无菌的压缩空气。继续发酵,当糖源分解掉一半时,再次加入等体积的停滞葡萄酒。重复添加停滞葡萄酒,直至总体积达到大约160L(整个过程可能需要12h至3d)。将160L发酵培养基和20g磷酸氢二铵加入到剩余的停滞葡萄酒(860L)中。Bisson和Butzke(2000)警告,二次发酵培养基的糖源不能被耗尽,或者糖度低于停滞葡萄酒。对于乙醇浓度超过14.5%(体积分数)的停滞葡萄酒,必须先降低乙醇含量,再二次发酵。

在采收和破碎时期,几乎不可能立即处理停滞葡萄酒。因此,必须稳定葡萄酒,预防进一步的微生物损害,将自然发酵的葡萄酒进行转罐和添加SO₂(30~40mg/L),并在低温下贮存,直到可用于重新发酵。供应商所推荐使用的酵母菌株必须采用更高水平的接种量[8~10lb/1000gal(0.96~1.2g/L)]。

8.5.2 硫化氢

在酒精发酵后期,可能会产生H₂S(Eschenbruch等,1978;Hallinan等,1999;Spiropoulos等,2000)。H₂S具有臭鸡蛋气味,且感官阈值非常低,仅为10⁻⁹级别(Henschke和Jiranek,1991)。H₂S也能作为前体物质,转变成其他还原性含硫化合物(硫醇),赋予葡萄酒中额外的臭味(Lambrechts和Pretorius,2000)。Montrachet通过实验证明了酵母菌株产生H₂S的能力存在差异,有一株菌可产生更大量的H₂S(Guidici和Kunkee,1994;Wang等,2003)。Sea等(1998)分析了数百种商品化的酵母菌株,却没有获得硫化物产量低且性状稳定的菌株。

由于氮源缺乏将促进H₂S的产生,因此降低H₂S产量的一个策略是在发酵之前或发酵期间向葡萄醪中补加营养物质(Vos和Gray,1979;Guidici和Kunkee,1994;Jiranek等,1995a;1995b;Hallinan等,1999;Tamayo等,1999;Park等,2000;Spiropoulos等,2000)。Jiranek等(1995a;1996)推断,在氮源缺乏时H₂S的过量产生是由于亚硫酸盐还原酶的还原作用所致,即使含氮前体与硫化物、O-乙酰丝氨酸(OAS)或O-乙酰高丝氨酸(OAH)发生反应,已被完全消耗(见图1.12)。

然而Sea等(1998)报道,H₂S与葡萄醪的含氮量之间相关性较弱,从而证明氮源并不是影响葡萄醪中产生H₂S的唯一营养因子。OAS和OAH被代谢耗尽后,会导致泛酸的缺乏,泛酸是合成乙酰CoA的必需因子,而乙酰CoA又是形

成这些前体物质所必需的成分（见图 1.12）。在合成培养基中，泛酸的缺乏会提高酿酒酵母合成 H_2S 的水平（Eschenbruch 等，1978；Slaughter 和 McKernan，1988）。Wainwright（1970）和其他研究者检测出，在合成培养基中还原性 H_2S 的生成量低于 $150\mu g/L$ 。

Wang 等（2003）报道，在影响 H_2S 形成时，氮源与泛酸之间存在复杂的关系（见图 8.2）。只有当泛酸浓度为 $250\mu g/L$ 时，随着氮源浓度的增加， H_2S 的产生减少。如果泛酸浓度低于 $50\mu g/L$ ，随着可利用氮源的增加， H_2S 的浓度反而增加。这一新发现的现象，就令人对以往向葡萄醪中添加氮源总能降低 H_2S 合成的观点产生了质疑（Tamayo 等，1999）。

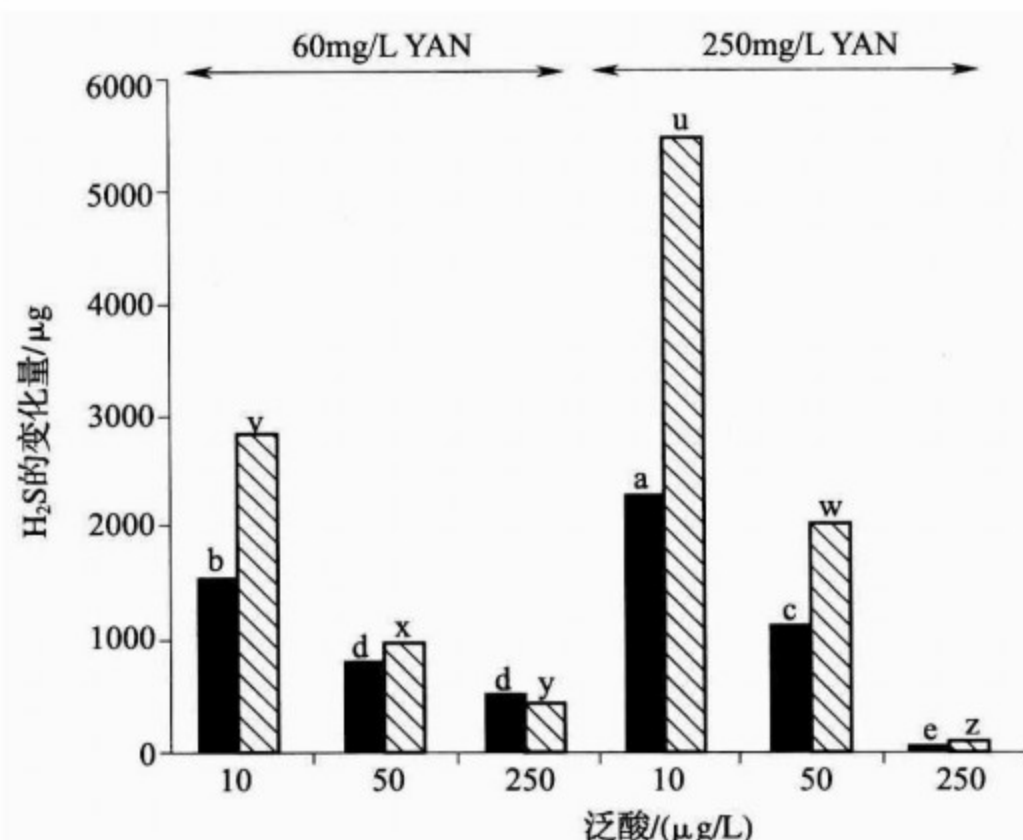


图 8.2 EC1118 (■) 或 UCD 522 (▨) 在含有不同浓度 YAN 和泛酸的合成葡萄醪中进行发酵， H_2S 的变化过程 [对于特定的酵母 EC1118 (a ~ e) 和 UCD 522 (u ~ z)，不同字母的显著性差异水平为 $p < 0.05$]

葡萄酒中影响 H_2S 产生的其他因素也有报道。例如，Karagiannis 和 Lanaridis（1999）研究了 SO_2 的添加、葡萄酒的浑浊度、酵母菌株、发酵温度和酒脚接触等因素对形成 H_2S 的影响。在其他的发现中，有研究者报道如果酒脚在葡萄酒中浸泡两个月，会增加 H_2S 的产生。虽然葡萄园中的硫元素也是 H_2S 的一个来源（Acree 等，1972；Eschenbruch，1974），但处理后的葡萄中可能含有高浓度的硫（Thomas 等，1993）。

8.6 苹果酸 - 乳酸发酵

许多综述都阐明了苹果酸 - 乳酸发酵对葡萄酒酿造的重要性（Kunkee，1967b；Davis 等，1985b；Wibowo 等，1985；Edwards 和 Beelman，1989；Henick -

Kling, 1993; van Vuuren 和 Dicks, 1993; Lonvaud - Funel, 1999)。在此过程中, L-苹果酸转变为 L-乳酸和 CO_2 。虽然乳酸菌能将葡萄糖转化成 D-、L-或 DL-乳酸 (见 2.4.), 但苹果酸-乳酸发酵中仅得到 L-异构体 (见图 8.3)。苹果酸-乳酸发酵能降低葡萄酒的酸度, 使 pH 升高 0.2 (Bousbouras 和 Kunkee, 1971)。

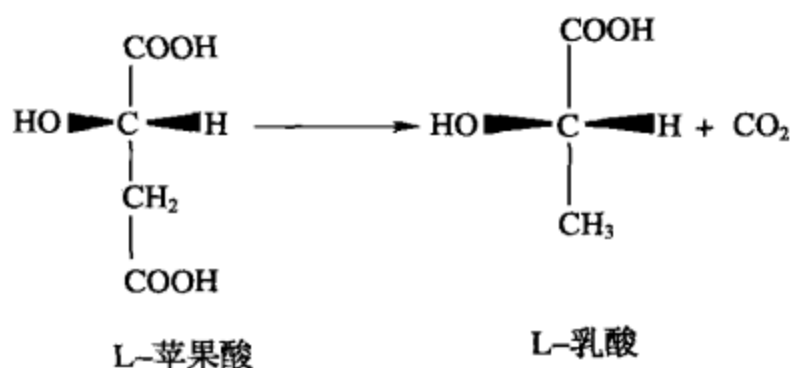


图 8.3 苹果酸-乳酸发酵中苹果酸到乳酸的转化

多种乳酸菌可进行苹果酸-乳酸发酵, 但常用的是商品化的酒酒球菌菌株, 如 ML-34、PSU-1、MCW、EQ-54、Viniflora 以及新命名的一些菌株。另外, 早期曾尝试选用乳杆菌中一些异型发酵的菌株, 如短乳杆菌和希氏乳杆菌进行苹果酸-乳酸发酵 (Hayman 和 Monk, 1982; Caillet 和 Vayssier, 1984)。乳杆菌中同型发酵的植物乳杆菌也被用作葡萄醪的降酸手段 (Pilatte 和 Prah, 1997; G - Alegría 等, 2004)。Pilatte 和 Prah (1997) 发现, 提高接种量, 可导致在酒精发酵之前先进行苹果酸-乳酸发酵。同型发酵时, 葡萄糖被代谢后产生乳酸而不是乙酸。Pilone 和 Prah (1990) 分析的菌株对乙醇较为敏感, 酒精发酵会降低该菌株的活性。然而, G - Alegría 等 (2004) 报道, 植物乳杆菌具有更高的乙醇耐受性, 可在酒精发酵后诱导苹果酸-乳酸发酵。

8.6.1 起始种子液的准备

在商品化菌株出现之前, 酿酒厂依靠自然的微生物菌群来诱导苹果酸-乳酸发酵。随着木制贮存容器的广泛应用, 普遍采用将保存的菌种预先制备好作为种子。将温度控制在 21°C 来起始苹果酸-乳酸发酵, 避免添加 SO_2 , 并保持 pH 高于 3.2 (Olsen, 1994)。假定在完成酒精发酵之后间隔数月进行苹果酸-乳酸发酵 (Wibowo 等, 1985), 由于葡萄酒缺乏保护, 可能会受到污染。未鉴定的乳酸菌所诱导的苹果酸-乳酸发酵, 会使葡萄酒产生不可预期或不良的风味特性 (Zeeman 等, 1982; Bartowsky 和 Henschke, 1995)。因此, Olsen (1994) 建议, 应定期检测葡萄酒中的微生物, 检测异味, 进行常规分析, 如对苹果酸和乳酸进行定量。

虽然一些酿酒厂仍遵循传统利用天然微生物, 但已逐渐在葡萄醪或葡萄酒中接种乳酸菌种子液, 以期提高苹果酸-乳酸发酵的成功率 (Davis 等, 1985b;

Fugelsang 和 Zoecklein, 1993; Henick - Kling, 1995)。虽然酿酒厂可以在稀释的葡萄汁或葡萄酒中培养菌株作为自己的起始种子液, 但酒球菌的许多菌株以冻干、冷冻浓缩以及液态等多种形式均可获得 (Beelman 等, 1980; Fugelsang 和 Zoecklein, 1993; Pompilio, 1993; Henick - Kling, 1995; Nielsen 等, 1996; Semon 等, 2001)。冻干的起始种子通常含有大量活的细菌 ($>10^8$ CFU/g), 而且便于运输和贮存。在接种前, 这些种子有时需要在稀释的葡萄汁和葡萄酒中进行复水活化和适应性培养 (Lafon - Lafourcade 等, 1983a; Krieger 等, 1990; Pompilio, 1993; Henick - Kling, 1995)。由于在冷冻和冻干的过程中细胞受到一定的损伤, 适应性培养的步骤是帮助其恢复损失的活性 (Liu 和 Gallander, 1983; Henick - Kling, 1993)。比较起来, 也可直接接种, 不需要驯化或复水的过程。冷冻浓缩物和液体培养物中的细胞密度较低, 酿酒厂在接种前需先进行扩培。

用于制备苹果酸 - 乳酸起始种子的培养基通常是补加了其他营养 (如酵母膏、蛋白胨和吐温 - 80) 的葡萄汁或苹果汁 (Pilone 和 Kunkee, 1972; Kunkee, 1974; Costello, 1988; Champagne 等, 1989; Krieger 等, 1990, 1993; Henick - Kling, 1993)。一个前培养的方法是接种于 pH 为 4.5, 用水 1:1 稀释, 且含有 5g/L 酵母膏的葡萄汁中。一旦培养液中细胞密度达到 $10^7 \sim 10^9$ CFU/mL, 就可以 1% ~ 5% (体积分数) 的比例直接接种到葡萄酒中。其他一些酿酒厂选用稀释的葡萄酒来制备起始种子, 是由于这样操作可减少腐败微生物污染的机率, 提高苹果酸 - 乳酸菌对乙醇的耐受性 (Hayman 和 Monk, 1982; Nault 等, 1995)。

8.6.2 菌株的选择

现在已有多株商品化的酒球菌, 酿酒师可直接购买用于葡萄酒生产中诱导苹果酸 - 乳酸发酵 (Pompilio, 1993; Henick - Kling, 1995)。有些菌株具有一些不同的、可能是特有的苹果酸 - 乳酸活性和生长特性, 所以被认为更适宜于诱导苹果酸 - 乳酸发酵 (Lafon - Lafourcade 等, 1983b; Fleet 等, 1984; Davis 等, 1985b; 1988; Izuagbe 等, 1985; Britz 和 Tracey, 1990; Rodriguez 等, 1990; Henick - Kling, 1993)。在这些菌株中较受欢迎的属性包括可在低 pH 条件下生长、对 SO_2 和乙醇的抗性、生物胺的合成水平低 (见 11.3.6) 以及与酿酒酵母的兼容性 (Liu 和 Gallander, 1983; Wibowo 等, 1988; Fugelsang 和 Zoecklein, 1993; Henick - Kling, 1993)。

8.6.3 接种的时机

当酿酒厂使用苹果酸 - 乳酸起始种子时, 需要确定细菌接种的时机。虽然细菌种子可以与酵母同时接种或在酒精发酵初期接种, 但一些酿酒厂在酒精发酵完全之后才接种 (Webb 和 Ingraham, 1960; Kunkee, 1967b; 1974; Henick -

Kling, 1993; Pompilio, 1993)。Fugelsang 和 Zoecklein (1993) 调查显示, 41% 的红葡萄酒生产商在酒精发酵期间添加起始种子, 17% 在酒精发酵结束后添加, 另有 17% 在浸渍结束并压榨后再添加。随着直接接种菌株的出现, 现在许多酿酒厂在完成主发酵之后添加菌种。

一些研究者建议, 苹果酸-乳酸细菌在早期接种效果最佳, 这是由于快速发酵可使葡萄酒厂尽快完成最后工序 (Kunkee, 1967b; 1984; Davis 等, 1985b; Henick-Kling, 1993)。这一观点认为, 酵母并不会耗尽苹果酸-乳酸细菌所必需的营养成分。此外, 对酒酒球菌具有抑制作用的乙醇和 SO_2 (Britz 和 Tracey, 1990) 在发酵液中的浓度较低。早期接种苹果酸-乳酸细菌, 能促进酒精发酵及完成苹果酸-乳酸发酵 (Beelman, 1982; Beelman 等, 1982; Beelman 和 Kunkee, 1985; Cannon 和 Pilone, 1993; Henick-Kling 和 Park, 1994; Huang 等, 1996; Nygaard 等, 1998)。有一些研究报道, 成功诱导了酒精和苹果酸-乳酸发酵的同时进行 (Beelman, 1982; Beelman 和 Kunkee, 1985; Henick-Kling 和 Park, 1994)。

早期接种苹果酸-乳酸细菌潜在的一个问题是酵母与细菌之间具有拮抗作用 (见 6.6.1)。拮抗作用会引起酵母抑制苹果酸-乳酸细菌, 从而导致苹果酸-乳酸发酵的延迟或失败 (Beelman 等, 1982; Lafon-Lafourcade, 1983; King 和 Beelman, 1986; Cannon 和 Pilone, 1993)。许多研究者发现, 在细菌接种后的短期内, 细菌的活性从 10^7CFU/mL 以上降至无法检测的水平, 这些结果支持上述的观点 (Beelman 等, 1982; Liu 和 Gallander, 1983; Wibowo 等, 1985; King 和 Beelman, 1986; Rodriguez 等, 1990; Cannon 和 Pilone, 1993; Henick-Kling 和 Park, 1994; Nygaard 等, 1998)。

此外, 由于可发酵碳水化合物的存在, 早期接种会导致产生乙酸 (Lafon-Lafourcade 和 Ribéreau-Gayon, 1984; Ribéreau-Gayon, 1985)。然而 Semon 等 (2001) 在酒精发酵早期或发酵过程中接种酒酒球菌后, 并未在葡萄酒中检测到过量的挥发性酸, 这与某些研究结果一致 (Giannakopoulos 等, 1984; Beelman 和 Kunkee, 1985; Rodriguez 等, 1990; Edwards 等, 1991)。Semon 等 (2001) 报道, 在酒精发酵之前接种酒酒球菌不同菌种制得的霞多丽葡萄酒, 其挥发性酸比在完成发酵后再接种制得的葡萄酒高, 但未超过合适的浓度范围, 这正是想要的结果 (见表 8.4)。

早期接种产生的第三个问题是苹果酸-乳酸细菌可能与酵母产生拮抗作用。Huang 等 (1996) 证明, 在葡萄酒酿造中一些乳酸菌能够抑制酵母。这些细菌中除了一株被鉴定为乳杆菌属的新菌种 (Edwards 等, 1998a), 其他都属于酒酒球菌 (Edwards 等, 1998b)。此外, 一些研究者报道, 与一些酒酒球菌的菌株共培养时, 提高了葡萄酒酵母的死亡率 (Beelman 等, 1982; Lafon-Lafourcade 等, 1983a; Beelman 和 Kunkee, 1985)。

表 8.4 在酒精发酵之前（第 0 天）或完成发酵之后（第 22 天）接种酒酒球菌
菌株 EQ-54 或 WS-8 制得的霞多丽葡萄酒的化学分析

酒酒球 菌菌株	细菌接种 的天数/d	pH	可滴定酸含量/ (g/100mL)	挥发性酸含量/ (g/100mL)	苹果酸含量/ (g/L)	乳酸含量/ (g/L)
未接种	—	3.55 ^d	0.72 ^a	0.014 ^c	4.49 ^a	0.73 ^d
EQ-54 [*]	0	3.82 ^a	0.49 ^b	0.040 ^a	1.70 ^{bc}	4.31 ^{bc}
	22	3.73 ^{bc}	0.48 ^b	0.026 ^b	1.48 ^d	4.64 ^a
WS-8 [*]	0	3.79 ^{ab}	0.48 ^b	0.040 ^a	1.65 ^{bcd}	4.17 ^c
	22	3.70 ^c	0.50 ^b	0.030 ^b	1.58 ^{cd}	4.56 ^a
WS-8 ⁺	0	3.72 ^c	0.49 ^b	0.034 ^{ab}	1.81 ^b	4.62 ^a
	22	3.73 ^{bc}	0.49 ^b	0.028 ^b	1.66 ^{bc}	4.44 ^{ab}

注：表中右上角不同的字母代表显著性差异水平（ $p < 0.05$ ）。
* 将冻干种子培养物复水活化后直接进行接种。
+ 在稀释的葡萄汁培养基制备起始种子培养物。
数据来源于 Semon 等（2001），由 Australian Journal of Grape 和 Wine Research 提供。

为了避免早期接种中潜在的问题，一些人提倡在完成酒精发酵后，再接种细菌种子培养物（Ribéreau - Gayon, 1985；Krieger 等, 1990；1993；Henick - Kling, 1993；Nygaard 等, 1998）。延迟接种具有最大限度减少酵母与细菌之间不利相互作用的优点，确保完成酒精发酵（Henick - Kling, 1993）。此外，采用这一方式培养时糖浓度较低，可降低细菌分解代谢碳水化合物形成不良副产物的几率（Lafon - Lafourcade 等, 1983a）。在酒精发酵之后，酵母发生自溶，释放的营养成分也有利于苹果酸 - 乳酸菌的生长（Fornachon, 1968；Beelman 等, 1982；Henick - Kling, 1993）。事实上，接种到葡萄酒中的细菌培养物维持 10^6 CFU/mL 的活性，当活性提高到 $> 10^7 \sim 10^9$ CFU/mL 时，将快速诱导苹果酸 - 乳酸发酵（Krieger 等, 1990, 1993；Henick - Kling 和 Park, 1994；Liu 等, 1995a）。

不幸的是，延迟接种细菌种子培养物将不能保证细菌的正常生长和苹果酸 - 乳酸发酵的启动。一些研究报道，当细菌接种到葡萄酒中后，细胞数量迅速降低，导致苹果酸 - 乳酸发酵延迟或不能进行（Beelman, 1982；Beelman 等, 1982；Liu 和 Gallander, 1983；Krieger 等, 1993）。延迟接种后细菌活性的损失是由葡萄酒中多种条件引起的，包括高乙醇浓度、低 pH、SO₂ 和其他抗菌化合物的存在以及酵母繁殖导致的营养不足（Kunkee, 1967b；Beelman 等, 1982；Krieger 等, 1993；Larsen 等, 2003）。

另一个影响细菌生长的因素是噬菌体的存在（Davis 等, 1985a；Henick - Kling 等, 1986a, 1986b；Arendt 和 Hammes, 1992）。因为细菌种子培养物可能

会遭到噬菌体的侵染, Davis 等 (1985a) 注意到, 当葡萄酒 $\text{pH} \geq 3.5$ 时, 噬菌体能够存活, 但在较低 pH 或添加了 SO_2 、膨润土, 噬菌体丧失活性。然而 Henick - Kling 等 (1986a; 1986b) 报道, $\text{pH} 3.2$ 的葡萄酒中 50mg/L SO_2 不能影响噬菌体的活性。在葡萄酒中噬菌体的污染程度并不清楚。

8.6.4 裂殖酵母的应用

既然裂殖酵母能利用 L - 苹果酸, 这种酵母可代替细菌, 用于高酸度葡萄醪的降酸处理 (Gallander, 1977; Snow 和 Gallander, 1979; Dharmadhikari 和 Wilker, 1998)。但粟酒裂殖酵母的某些菌株生长时会产生具有不良感官特性的物质 (Gallander, 1977; Snow 和 Gallander, 1979; Yokotsuka 等, 1993)。Yokotsuka 等 (1993) 和 Silva 等 (2003) 成功地将粟酒裂殖酵母细胞进行固定化或包埋处理, 这样在苹果酸被耗尽但合成异味物质之前, 可方便地除去酵母细胞。另外 Thornton 和 Rodriguez (1996) 提议, 解苹果酸裂殖酵母 (*S. malidevorans*) 的突变株代替粟酒裂殖酵母, 用于葡萄酒的降酸。

8.7 发酵后处理

在酒精发酵和苹果酸 - 乳酸发酵 (如果采用) 完成之后, 葡萄酒需要进一步的处理, 这可能会潜在地影响微生物的生长。在红葡萄酒贮存期间, 一个最重要的腐败问题就是由酒香酵母引起的, 11.2.2 对此有详细的介绍。

8.7.1 陈酿和贮存

完成酒精发酵和苹果酸 - 乳酸发酵后, 葡萄酒就会在木制 (橡木) 桶中存放不同的时期, 进行陈酿。由于橡木桶不完全密封, 乙醇、水和氧会以不同的速率在橡木桶内外进行扩散。橡木桶内环境的改变会促进或抑制许多腐败微生物的生长, 如醋菌属细菌 (见 11.2.1) 和产膜酵母 (见 11.2.3)。如果酒窖的相对湿度低于 60%, 桶装葡萄酒中的水分就会优先挥发掉 (乙醇含量会增加)。但当相对湿度高于 60% 时, 乙醇会优先损失 (乙醇含量会降低)。这一现象在橡木桶顶部空间表现得更为明显, 并且会促使充足的氧进入桶中, 维持好氧微生物如醋菌属和产膜酵母的增殖。

通过控制湿度和温度, 可以减缓桶中的蒸发过程。现已开发出一些商品化的雾化系统。除此之外, 有效的密封和定期添酒, 对橡木桶的陈酿过程也非常重要。在用塞子塞紧的橡木桶中, 水和乙醇扩散到桶外, 使桶的顶部空间形成部分的真空状态。由于塞子与桶之间不完全的密封, 为了最大限度减少氧的侵入, 葡萄酒生产商常常选择传统的木制塞子, 使橡木桶呈正立或轻度倾斜状态, 保持塞子的湿润。现在可利用具有良好密闭性能的硅胶塞, 而且使用时无需保

持湿润状态。硅胶塞的使用,可使工人正置橡木桶,减少添酒所需的时间和工作量。但是按照操作规程进行补料是至关重要的,补料太频繁反而会因加速氧的进入,带来更大范围的腐败。

有时装葡萄酒的容器中存在多余的空间。与木制桶相比,更应该选用能有效密封的不锈钢罐。当葡萄酒转移到容器中后,可向顶部通入 N_2 或 CO_2 等较便宜的气体,然后再进行密封,但氩气的效果更好。因为 N_2 在葡萄酒中的溶解度远低于 CO_2 (N_2 的溶解度为 14mg/L , 而 CO_2 的溶解度是 1500mg/L), 所以 N_2 不易溶解,在葡萄酒的表面存在时间更长。但是 N_2 的摩尔质量 (28g/mol) 与 O_2 相近 (32g/mol), 可能发生氧有效代替氮的现象。由于 CO_2 的摩尔质量为 44g/mol , 故可提供更有效的环境保护。然而, CO_2 在葡萄汁或葡萄酒中的溶解性,仅在短时期内降低了这种隔绝作用。由于这些限制,氩成为酿酒厂首选的密封气体。氩的摩尔质量为 40g/mol , 比氮或氧重,且溶解性低于 CO_2 。

为了最大限度降低微生物造成的损害, Ough 和 Amerine (1966) 推荐,维持 $13\sim 18^\circ\text{C}$ 的酒窖温度,贮存白葡萄酒和干红葡萄酒。

8.7.2 挥发性酸的调节

过去,将需调节的葡萄酒与醋酸含量很低的葡萄酒进行混合,以调节酒中的挥发性酸。不能直接用化学方法中和乙酸,这是由于更强更稳定的酸(酒石酸和苹果酸)会被优先中和。利用传统阴离子交换方法处理葡萄酒时,也遇到了相类似的问题。近年来,反渗透与离子交换技术的联合使用,取得了成功 (Smith, 2002)。此时,含有乙酸、乙醇和水的渗透液流经阴离子交换柱,可除去乙酸(见图 8.4)。除去乙酸后,将渗透液与滞留液进行混合。这种系统中,也可将渗透液进行蒸馏,以除去葡萄酒中的乙醇。

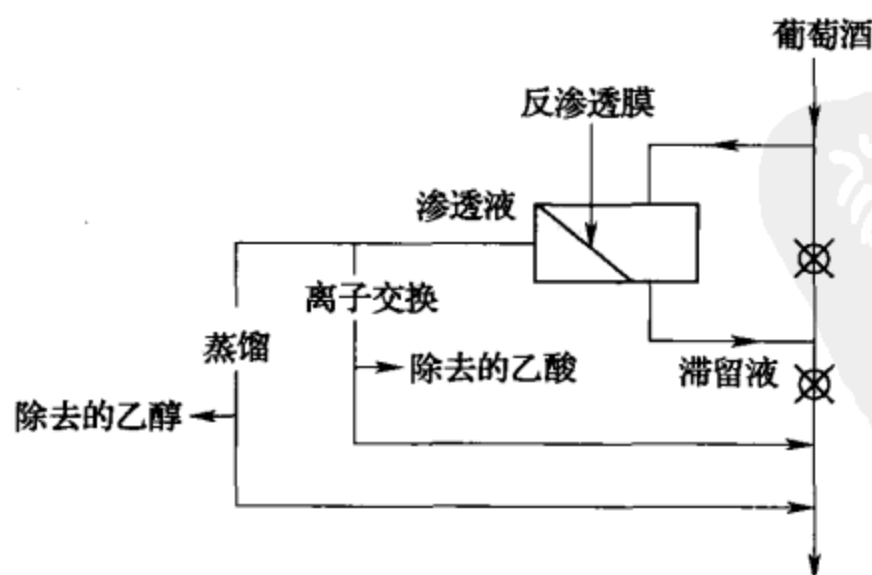


图 8.4 利用反渗透和其他处理技术除去乙酸和/或乙醇

8.8 装瓶

获得最终的混合液后,葡萄酒就可以进行装瓶了。检测葡萄酒的化学不稳定性和微生物学不稳定性后,酿酒师还需要考虑如何稳定产品,抑制装瓶后酒中的微生物活性。对于这一点,可利用特殊的防腐剂或杀菌剂抑制微生物活性(见5.2)或过滤除菌(见5.3)。虽然将葡萄酒加热到一定的程度,可能会杀死所有的微生物,但使用传统热灌装方法时要特别小心,因为酒的品质会被迅速破坏。有趣的是,Malletroit等(1991)并没有发现巴氏杀菌法对375mL瓶装白诗南葡萄酒的感官品质有任何影响。

决定是否无菌过滤和包装,部分基于葡萄酒固有的化学和微生物学特性。有些葡萄酒在装瓶后很少表现出微生物不稳定性。例如,含有14.5%(体积分数)乙醇、 $<2\text{g/L}$ 还原糖、 $<30\text{mg/L}$ 苹果酸和 $>50\text{mg/L}$ 总 SO_2 的红葡萄酒很少需要无菌过滤,而含有11.5%(体积分数)乙醇、 $>5\text{g/L}$ 还原糖、 $>0.5\text{mg/L}$ 苹果酸和微量 SO_2 的白葡萄酒却通常需要无菌过滤。另一个例子是在灌装前具有“Brett-character”味的葡萄酒。如果不过滤,则葡萄酒灌装后会有很大的可能性遭到微生物污染。

决定是否过滤的另一个因素是过滤会对葡萄酒品质产生潜在的影响,这一影响在葡萄酒工业中引发了许多争议。一些酿酒厂采用常规方法定期对葡萄酒过滤除菌,而另一些酿酒厂则认为过滤会严重降低葡萄酒的品质。Arriagada-Carrazana等(2005)报道,赤霞珠葡萄酒用 $0.65\mu\text{m}$ 膜过滤后,不仅色度会下降,而且在测定的100多种香气成分中,有12种成分的浓度降低。虽然过滤后的葡萄酒在感官上存在差异,但无法确定产生差异的特定化合物,也无法对此定量分析。Gergely等(2003)用错流式过滤处理一些葡萄酒,并未产生感官差异,而Peri等(1988)认为,超滤膜不适合用于葡萄酒处理,会导致葡萄酒中聚合花色苷的损失。

最后,酿酒厂将基于成本做出决定。在这种情况下,额外的无菌包装成本无法在产品最终的价值中体现出来。除了无菌过滤,酿酒厂可以选择化学防腐剂来抑制灌装后微生物的污染。

不管是无菌过滤处理还是加入化学防腐剂来稳定葡萄酒,都应进行灌装后微生物的检测,以确保处理效果。在装瓶过程中,至少每间隔1h就应收集瓶装酒。因为灌装后的成品酒中微生物的数量很低甚至检测不到,所以应对葡萄酒膜过滤后进行检测(见14.5.3)。在灌装生产线刚开始运行和员工结束休息重新工作时,都必须立即取样。此时,由于泵突然启动产生的水流冲击,可能提供足够的推动力,导致留在膜上的微生物能够穿过滤膜。如果葡萄酒中腐败微生物数量增加,应检查过滤膜的完整性。Loureiro和Malteito-Ferreira(2003)指

出，无菌过滤器出口、填料（特别是钟型垫圈和橡胶垫片）、打塞机（软木塞钳夹和加料斗）、瓶子杀菌设备、瓶口、环境中的空气都是发生污染的关键之处。这些地方都应周期性取样，检测微生物的生长情况（见 9.8）。对打塞机的软木塞钳夹喷洒 70%（体积分数）乙醇，以及再次使用软木加料斗，都可以减少微生物污染的概率。



第9章 葡萄酒厂清洗消毒

9.1 引言

葡萄在生长及运送过程中吸附的微生物不仅可以存活，而且可能在酿酒过程的任何一个阶段再次扩散（见第7章和第8章）。在葡萄酒厂，设备表面残留的葡萄残渣促进了后续步骤中微生物的迅速扩散，导致微生物的蔓延。因为这些微生物很容易造成腐败，酿酒师在葡萄处理前期应尽可能预防腐败菌的生长，避免在后期造成交叉污染。正确的操作规范需要在葡萄处理过程中对葡萄皮所能接触的任何表面，从采收设备、采摘环（picking lugs）、货车、发酵罐、软管及大罐等都需要进行定期、彻底的清洗和消毒。

在酿酒厂，“清洗”和“消毒”代表了两种不同但非常重要的操作单元。清洗是从设备表面除去矿物质、有机物或残渣，而消毒则是指采用化学物质或加热（如蒸汽）等手段减少或消除微生物的存在。彻底的清洗和消毒操作能够减小矿物质和有机物残渣的积累，从而减少微生物的繁殖和二次感染。必须牢记：（a）没有经过正确清洗的设备不能消毒；（b）清洗干净的设备也并不意味着已经被消毒。因此酿酒厂员工必须在消毒前彻底清洗设备表面。

在卫生消毒过程中所使用的化学术语有些混乱。如抗菌物质经常被错指为灭菌剂（sterilant）、消毒剂（disinfectant）和/或抑菌剂（sanitizer）。但定义规定灭菌剂是指能杀死所有能繁殖的微生物包括孢子病毒，而消毒剂是指能破坏或消灭活着的（有生长能力的）细胞但不一定包括细菌的孢子。而抑菌剂是指将活细胞的数量降低至可以接受的数量以下。

9.2 安全问题

酿酒厂清洗消毒过程中存在的潜在危险包括：（a）强氧化剂、腐蚀性和/或酸性化合物；（b）高压热水和/或蒸汽；（c）光滑的地面。因此操作人员必要的个人防护设备（PPE）包括手套、护目镜、合适的靴子以及防水围裙（见19.2.7）。如果洗涤剂流到地面时容易使人滑倒，必须穿防滑的靴子。理论上，裤子最好不要塞进靴子里，以防热水或其他化学物质直接进入靴子。操作人员

在操作前必须阅读生产说明，明白操作程序。包含操作人员健康及安全信息的化学品安全技术说明书（Material Safety Data Sheet, MSDS）需要放在清晰可见便于阅读的地方（见第 19 章）。另外，干性化学物质必须加入冷水而不是热水中。

9.3 水质

首先必须考察清洗用水的质量，特别是化学及感官特性的检测。一般来说清洗用水达到饮用水标准，无悬浮物，对气味或风味有影响的物质含量低（如“泥土味”或“霉味”）。另外针对水源（井水或自来水）的水质，每年需要进行 2~4 次的检验。常规分析包括 pH、碱度、钙硬度、铁、硅、可溶性固形物以及微生物含量。

另外还需要关注水的硬度。因为含有钙、镁及其他碱金属的硬水能极大地影响去污剂的效果，特别是含重碳酸盐的水容易在设备中形成沉淀或“水垢”。这些水垢不仅会减少设备的有效使用体积，还有利于有机物残渣和微生物的形成和积累，对后期的消毒造成极大的困难。目前降低硬水危害的最低廉的方法是安装水软化装置，软化硬水。

如果没有水软化系统，许多去垢剂包含特殊的添加剂，都能降低水的硬度。如金属螯合剂能够通过物理作用除去水中的金属离子而使水软化。另一类广泛使用的多磷酸盐也能够有效地与钙离子和镁离子螯合并避免形成沉淀。典型的多磷酸盐是六偏磷酸钠（如 Calgon[®]）和四磷酸钠（Quadrofos）。除了磷酸三钠外，这类化合物均不具有腐蚀性。另外，乙二胺四乙酸（EDTA）也经常作为金属螯合剂使用，虽然比多磷酸盐昂贵，但 EDTA 具有相对更高的热稳定性。金属螯合剂能够与水中的矿物质（金属离子）结合，从而提高后期清洗的效果。

9.4 初步清洗

任何清洗过程，第一步都是尽可能多地去除表层或可见的杂质。这一过程可以通过人工或机械清洗系统完成，如喷雾器或清洗机。经常使用不添加化学物质的高压水（即 4000~8000kPa）来清洗有机物或杂质。这种方法比采用清洁剂或消毒剂更经济。采用这种方法清洗设备角落的泡沫等杂质，效果更明显。另外采用高压温水（38~43℃）能进一步提高清洗效果，还能减少用水量，加快清洗速度。一般不推荐采用热水进行初步清洗，因为采用热水清洗后有些有机物更容易吸附于设备表面，从而需要花费更多的精力和成本。

为保护不锈钢设备表面的防氧化涂层，只能在必要时使用柔软的刷子进行

洗刷。一旦不锈钢表面被刮伤,损伤表面极易因氧化而腐蚀。因此,绝对不能用毛刷或金属刷子来除去顽固的污渍。

9.5 去污剂、清洗剂 and 表面活性剂

当除去大多数的残渣及垢膜后,需进一步清洗设备表面。一般可用去污剂或清洗剂来溶解仍然存在的污垢。每一种清洗剂都有各自的特性和最有效的使用参数,一般来讲,使用高于推荐量的清洗剂并不能明显增加清洗效果,而且也不经济。另外,也应控制清洗剂与设备表面的接触时间,清洗剂种类及使用方式不同,与设备表面接触的时间也不同。高压喷雾比泡沫及凝胶态的清洗剂需要的接触时间要短。然而,凝胶态可以与清洗表面接触较长时间,而且可以在低压系统下使用(Wirtanen 和 Salo, 2003)。

特定的清洗剂含有一些不同的成分,包含不同比例的碱、酸、表面活性剂和螯合剂。这种混合制剂常被称为“复合清洗剂”或“复合去污剂”,根据组成成分的不同就可以在一步操作中达到多重的清洗效果。酿酒厂也可以根据自己的需要选择不同的化学物质进行配比使用。需要强调的是,使用复合清洗剂时一定要按照化学品供应商所给的信息来进行正确的配比,不准确或不合适的配比混合可能产生有毒的气体,对工人造成伤害。

9.5.1 碱

最常用的清洗剂包括强碱或腐蚀性的碱,如 NaOH (苛性钠或碱水) 或 KOH (苛性钾)。尽管 NaOH 和 KOH 对油脂和蛋白质等都具有很好的清洗效果,但 KOH 的效果更好。有一种方法是将 10 ~ 20g/L NaOH 在热水 (75 ~ 80℃) 中清洗 15 ~ 20min (Wirtanen 和 Salo, 2003)。如果这些化合物超过推荐用量,即使对不锈钢材料也是具有腐蚀性的。

酿酒厂也使用一些其他的碱性化合物。正硅酸钠和偏硅酸钠 (Na_2SiO_3) 比 NaOH 的腐蚀性要小,具有更好的清洗效果,对设备的腐蚀性也较小。中性碱如碳酸钠 (苏打粉) 或磷酸三钠适于清洗有机质相对较少的设备。碳酸钠 (Na_2CO_3) 是经常使用的清洗剂,成本较低,但与硬水一起使用时容易形成沉淀。而磷酸盐能够螯合钙镁离子使水软化,减少矿物质的沉积,从而有利于更好的清洗 (见 9.3)。

9.5.2 酸

磷酸 (H_3PO_4) 能够溶解矿物质,广泛应用于复合洗涤剂。其他酸也能用于复合洗涤剂中,但这些酸往往会腐蚀金属设备。例如硝酸能有效去除一些很难溶解的矿物质,但会加快垫圈材料的降解。

9.5.3 表面活性剂

作为一种润湿剂，表面活性剂是具有亲水基团和疏水基团的有机分子。表面活性剂由于能够降低水的表面张力，因此是一种表面活性成分，能够通过增强清洗剂与待清洗表面的接触来促进设备表面吸附的残渣及微生物的脱离（Wir-tanen 和 Salo, 2003）。在这三种表面活性剂中（见图 9.1），非离子型表面活性剂的化学结构，因其具有极好的润湿及乳化性能，使用最为广泛。非离子型表面活性剂具有不同的起泡能力，这对某些设备的清洗十分重要。

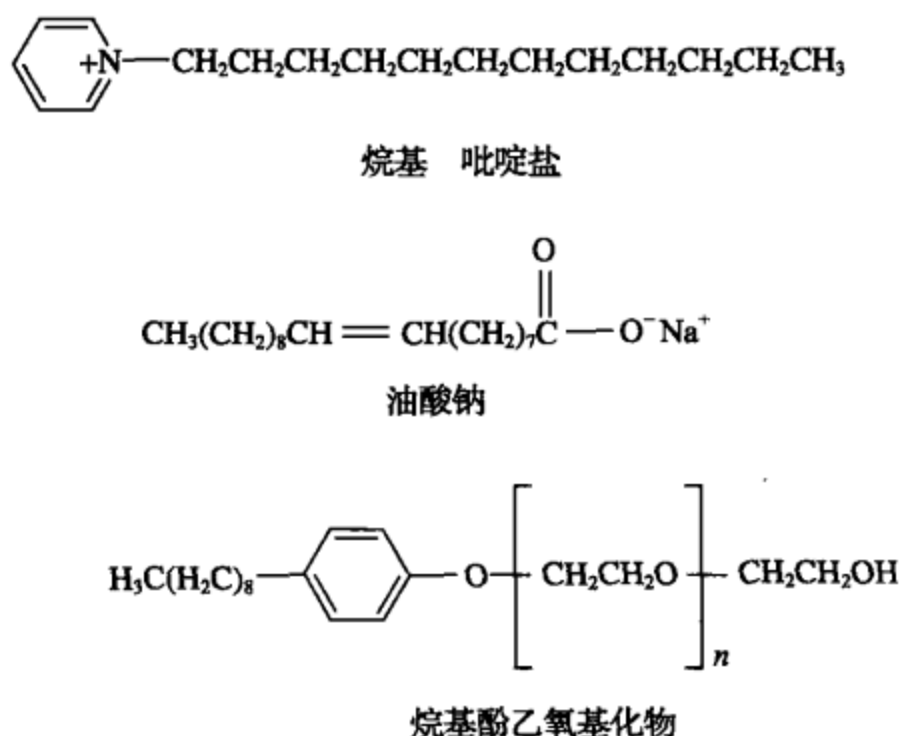


图 9.1 阳离子型（烷基吡啶盐）、阴离子型（油酸钠）和非离子型（乙氧基烷基苯酚）表面活性剂

9.6 漂洗

清洗后，为除去设备表面残留的化学物质及残渣，需要进行彻底的漂洗。最初一般用热水或冷水进行漂洗，适当使用弱酸（如柠檬酸）能够有效中和残留的碱性清洁剂。另外，进行酸漂洗能减少矿物杂质的残留。但是，酸性溶液在 pH2.5 时能发挥最优效果，但此时对不锈钢及其他材料具有腐蚀作用。如前所述，一般选择使用腐蚀性较弱的磷酸。

9.7 抑菌剂

除去设备表面的沉淀及残渣，设备表面清洗干净后就该进行消毒杀菌。抑菌剂包括卤素（如碘）、热水、臭氧、过氧化物、季铵化合物（QUATS）或酸性 SO_2 。表 9.1 比较了一些常用化学抑菌剂的优缺点。

表 9.1 抑菌剂的一般特性

消毒剂	优点	缺点
碘伏	无腐蚀性，便于使用，抑菌谱广	价格昂贵，可能会对风味产生影响
季铵化合物 (QUATS)	高效、无毒，能有效抑制微生物的生长， 无腐蚀性，无刺激性	在低 pH 及 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的影响下容易失活，对革兰阳性菌无效
过氧乙酸	浓度较低时作用仍很明显，抑菌谱较广， 能穿透生物膜，无毒（形成乙酸和水）	具有腐蚀性，不稳定
SO_2 （酸性）	便宜，易获得，在合适的 pH 下对大多数微生物有效	效果取决于 pH 及微生物的种类，在高浓度时具有腐蚀性
臭氧	作用效果同氯，分解为 O_2 ，无残留，能穿透生物膜	具有腐蚀性，易失活，易与有机物反应，需要安全监控

注：摘自 Wirtanen 和 Salo（2003）。

在消毒过程中，所有的化学试剂都有规定的使用浓度。任何不遵守使用要求或规定的做法都是不符合规范的，且容易造成安全隐患。因此在使用过程中必须严格遵循供应商的使用要求。

一旦消毒过程完成，设备表面需要立即进行漂洗以除去残余的抑菌剂，然后排干积水。例如，一般采用柠檬酸来清洗容器和消毒软管，以中和残余的碱。理想情况下，在最后的漂洗阶段一般应通入无菌水。

9.7.1 碘

含碘和酸（一般为磷酸）的配方被称为碘伏。碘伏在 25mg/L 具有良好的作用效果，与 200mg/L 氯的作用效果相似（Jennings, 1965）。碘伏具有广谱的杀菌效果，研究证明其对各种细菌、酵母及霉菌都有效果。消毒后残留的碘能通过简单的试纸检测。

碘伏不容易被微生物降解，在适宜的使用浓度下没有刺激性。商品化的碘伏产品说明中一般都有“可滴定碘”的说明，表示产品中所含碘的最低含量。这些配方在 I_2 最大浓度下，在 $\text{pH} \leq 4$ 时具有最好的作用效果。但 I_2 在 $>49^\circ\text{C}$ 时极易挥发，因此不能与热水一起使用。碘伏容易形成过多泡沫，使聚氯乙烯材料染上颜色，且价格也比较昂贵。

9.7.2 季铵化合物

季铵化合物（QUATS）的基本结构是一个氮原子与四个烷基芳香烃或其他芳香族基团形成共价键（见图 9.2）。QUATS 通过破坏微生物的细胞膜达到灭菌效果，但它对细菌、酵母及霉菌具有不同的杀菌效果。革兰阳性菌（酒球菌、片球菌和乳杆菌）对其最敏感，革兰阴性菌（醋杆菌和葡糖杆菌）次

之。QUATS 对细菌内生孢子壁和真菌孢子的作用效果较弱, 且对噬菌体没有效果。

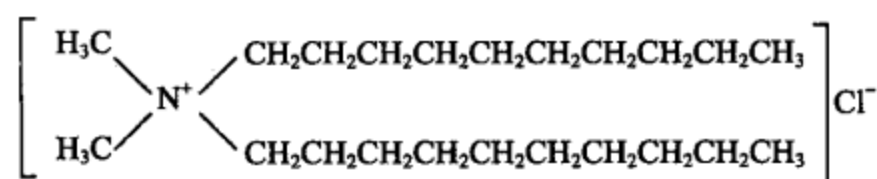


图 9.2 一种 QUAT——双十烷基二甲基氯化铵的结构式

与其他抑菌剂比较, QUATS 具有以下优点: 作用 pH 范围较广, 具有持续的杀菌效果 (如未漂洗干净), 热稳定性好且不具有腐蚀性。另外在使用硬水或设备表面不干净的情况下, 作用效果也不会减弱。QUATS 的一般使用浓度为 200 ~ 400mg/L, 在使用后需要彻底洗净。

在酿酒企业中, QUATS 一般用于抑制容器、墙壁、地面或排水沟中的霉菌。在使用过程中容易飞溅到设备表面而不易被漂洗干净。根据环境条件和霉菌的生长状况, 这一过程可能会持续几周。

9.7.3 二氧化硫 (SO₂)

在酿酒历史中, SO₂ 被酿酒师广泛使用, 以控制微生物的生长。出于健康的考虑 (Yang 和 Purchase, 1985), 一些酿酒厂明显降低了 SO₂ 的使用量, 这增加了微生物腐败的风险。

SO₂ 是一种有效的抑菌剂, 特别适用于软管。因为 SO₂ 的作用效果与 pH 密切相关 (见 5.2.1)。一般用 3g/L 的柠檬酸溶液来配制这种抑菌剂 (100mg/L SO₂ 或 200mg/L 焦亚硫酸钾)。SO₂ 的挥发性及腐蚀性致使其只能在通风条件好的环境下使用, 而且不能用于金属表面的消毒。基于这个原因, 操作人员也同样应避免直接接触或吸入 SO₂。虽然酿酒厂一般用酸性热水 (60℃) 配制这种抑菌剂, 但这一操作也增加了 SO₂ 的挥发性, 同时增加了安全隐患。因此, 需要密封保存 SO₂ 溶液, 从而将其挥发性降至最低。

9.7.4 过氧化物

过氧化物 (或 “proxy” 化合物) 是一类至少含有一对高反应活性共价氧原子 (—O—O—) 的化合物。包括具有强氧化性的过氧化氢和过氧乙酸。

过氧化氢 (H₂O₂) 的使用浓度为 3% ~ 30% (体积分数), 降解产生具有毒性的过氧根离子 (O₂⁻)。一般普通药房均出售 3% 过氧化氢溶液, 以用于浅表伤口的消毒使用。高浓度的过氧化氢溶液 (30%) 必须通过化学试剂公司购得。过氧化氢在酿酒厂的使用比较有限, 可用于汽酒生产过程中除去 SO₂, 但这种操作容易造成酒体的氧化。

高于 5% (体积分数) 浓度的 H₂O₂ 具有很强的刺激性, 容易引起暴露皮肤

的灼伤和水泡。因此使用这种试剂的员工必须经过训练,且务必谨慎操作。 H_2O_2 必须储存在密封容器中,否则极易降解,即使按照规定正确储存, H_2O_2 也会逐步分解。因此最好定期更换实验用的过氧化物(3%)。

过碳酸钠是一种性能稳定的粉末,可分解成 H_2O_2 和 Na_2CO_3 。作为一种活性物质,广泛应用于洗衣粉、织物漂白和假牙清洗、纸张漂白和酒桶处理中。其反应活性部分相当于27.5%的 H_2O_2 ,与 H_2O_2 相似,在整个反应中降解成氧、水和碳酸钠。

在酿酒工业中,过碳酸钠的商品名为 ProxycarbTM,广泛用于被腐败微生物污染的酒桶的消毒及去除存在的异味。由于木桶具有多孔的特点,与其他的酒桶处理方法类似,过碳酸钠也并不能完全杀死木桶中所有的微生物。但在清洗消毒过程中,微生物会存在于抑菌剂无法到达的角落。在使用含有过氧化物成分的清洁剂/消毒剂之前,必须对员工进行培训,使用时要注意安全。

过氧乙酸(PAA)也称为“过乙酸”,与过氧化氢相似,具有强氧化性和抗菌特性。PAA作为灭菌剂和抑菌剂,与 H_2O_2 相比,具有如下优点:使用时(100~200mg/L)稳定性较好;在硬水中不影响使用效果;泡沫少等。与氯相比,PAA具有生物可降解性和腐蚀性较小的优点。

与 H_2O_2 相似,浓缩的PAA(400g/L)是具有高毒性的氧化剂,因此操作人员在使用前必须经过特殊的训练。稀释后的PAA主要用于酒桶及灌装线的消毒杀菌。

9.7.5 氯及氯化物

氯及氯化物清洗剂在酿酒及食品工业中已有很长的使用历史,其活性成分次氯酸是一种强氧化剂和抗菌剂。虽然这些抑菌剂成本低廉、使用方便,但若初步清洗不完全,则有机残渣极易使其过早降解。同时含有氯化物的抑菌剂容易损坏不锈钢及铝质设备,使设备表面及焊接处形成腐蚀斑点和凹坑,使清洗和消毒更加困难(Frank和Chmielewski, 2001)。虽然这些腐蚀斑也可能是由于高浓度的 SO_2 造成的,但一般来说主要还是由于使用氯化物类抑菌剂造成的氯腐蚀。

另一个值得考虑的问题是酿酒厂使用氯时可能会形成2,4,6-三氯苯甲醚(TCA)。多种微生物可以氯化物作为前体生成这种化合物(见4.6.3),能引起酒中产生“霉味”或“软木塞味”(Lee和Simpson, 1993)。酒厂使用氯和/或氯化物类抑菌剂,还容易在环境中形成TCA(PenaNeira等, 2000)。出于以上原因,建议酿酒厂应该减少甚至取消氯的使用。如果使用氯化物类抑菌剂,不得与酸性化合物混合使用(容易形成有毒气体和/或爆炸性物质)。

9.7.6 热水和蒸汽

热水(>82℃)和蒸汽是理想的灭菌剂。两者都具有良好的渗透性、无腐

蚀性、对果汁及葡萄酒中微生物作用明显等优点。例如 Wilker 和 Dharmadhikari (1997) 比较了不同处理方法对感染醋酸菌酒桶的效果, 结果表明采用热水处理 ($85 \sim 88^{\circ}\text{C}$, 20min) 效果最为理想 (见 11.2.1)。但热水/蒸汽对垫片的腐蚀速度要明显高于其他处理方法。

热水/蒸汽灭菌一般用于酿酒厂灌装线或不锈钢容器的消毒灭菌。使用热水对灌装线进行抑菌处理时, 一般采用 $> 82^{\circ}\text{C}$ 的热水保持 20min 以上, 一般选取灌装线末端进行温度监控。当使用蒸汽对容器进行抑菌时, 推荐持续通气直到阀门处冷凝水的温度达到或超过 82°C 并保持 20min。在这两种情况下都需要在最远离蒸汽源的点进行温度测量控制 (如管线的末端、喷管出口等)。在采用热水或蒸汽对容器进行抑菌时需要注意的是容器内部的分支阀、支架臂及其他浸入容器中的部分可能存在消毒时间及温度不够的情况。

9.7.7 臭氧

臭氧 (O_3) 是一种最具潜力的抑菌剂, 其在食品工业中的应用也逐渐增加。尽管臭氧是一种很强的氧化剂, 但其化学性质不稳定, 根据存储环境的不同, 半衰期一般只有 20 ~ 30min (Khadre 等, 2001)。

臭氧一般溶于水中使用, 而不是以气体状态直接使用。由于 O_3 会很快降解为 O_2 而不能长期储存, 必须现配现用。臭氧的生成是通过专门的设备将干燥的空气暴露于紫外线 (185nm) 或经放电过程而产生。 O_3 在灌装线的 CIP 操作及对自来水中异味及颜色的处理中使用最为广泛。

虽然使用臭氧需要特殊的设备, 但采用臭氧消毒却有很多优势, 可以抵消其额外的设备费用。如臭氧对细菌、真菌、病毒、原生动物及细菌和真菌孢子都有消毒作用 (Khadre 等, 2001)。另外 Hampson (2000) 观察发现臭氧对不锈钢设备 (316L) 的腐蚀性要小于氯。并且 Greene 等人 (1994) 也发现采用臭氧处理过的几种垫圈 [丁腈橡胶、白丁腈橡胶、EPDM (乙烯丙烯二烃单体)] 之间只有极其微小的区别。

从健康及安全角度出发, 臭氧具有很强的刺激性且不容易控制。臭氧容易引起肺、喉、鼻及眼部发炎。美国职业安全及健康管理局 (OSHA) 对环境中的臭氧浓度进行了规定: 人体连续 8h 处于臭氧环境中时, 臭氧的最高浓度不得高于 0.1mg/L ; 而短期 (10min) 接触的最大限制浓度为 0.2mg/L (Khadre 等, 2001)。在使用臭氧时, 员工必须经过训练, 同时采用合适的臭氧安全监控器。

9.8 卫生控制

虽然通过清洗及消毒能显著降低微生物数量, 但根据剩余的残渣及清洗效

果,仍有部分微生物会存活。例如,沉积在设备中的微生物能够吸附于设备表面并生长繁殖形成菌落,即通常所说的“生物膜”。最终这些菌落会进一步增长并吸附泥土、杂质、营养及其他微生物(Kumar 和 Anand, 1998)。Nel 等(2002)也观察到了不锈钢设备上酒球菌形成的生物膜。

众所周知,“生物膜”能增加微生物对抗菌素的抗性并使其更难以除去(Kumar 和 Anand, 1998; Wirtanen 和 Salo, 2003)。采用就地清洗系统时,使用碱洗(75℃, 30min)和酸洗(75℃, 30min)能有效去除“生物膜”(Parkar 等, 2004)。近来采用遥感技术成功测定了难以检测部位的“生物膜”(Tamachkiarow 和 Flemming, 2003)。一般来说,设计合理有效的清洗及抑菌工艺能有效地除去微生物及杂质,进而限制“生物膜”的形成(Kumar 和 Anand, 1998)。

为了以防灭菌后设备中的微生物残留,需要对所有抑菌操作的效果进行评估。评估过程中的取样点需要包含所有可能存在微生物残留的设备部位,特别是直接与外部表面接触的部位,如除梗破碎机、压榨机、管道内部、输送设备、贮存设备。其他取样点包括可能形成间接污染的部位如天花板或设备易形成冷凝水的部分、喷雾剂和润滑油的涂抹部位。

虽然微生物学方法能够评估设备表面的清洁程度,但各种方法都具有难以量化的问题。例如,如果设备表面存在凹痕或不规则会对取样造成困难。采用这些方法往往需要几个小时甚至几天才能得到检测结果(如平板法),且不能因为等待结果而造成生产过程的延迟。通过观察设备表面是否“光滑”或存在“异味”来检测设备清洗或抑菌的效果,不是很科学。虽然这种方法有时可满足发酵罐及储存罐的检测要求,但对于灌装线则需要更完整的微生物检测。

9.9 进度表及相关规定

每个酿酒厂针对清洗和消毒过程都应该制定整套标准的操作规程(SOPs)。标准操作规程必须包含具体方案、进度表以及记录方案和进度表执行程度的方法。

在起始阶段,建议每隔8h对除梗破碎机和压榨机进行清洗、漂洗和抑菌的完整过程。对于容易积聚糖的传送带及料斗也需要进行相似的操作。大罐在使用完毕后需要进行彻底的清洗和抑菌,在下次使用前需要用高压水进行冲洗。底部和侧壁的清洗口应该打开,以保证排水畅通和空气的流通。此时,可以在清洗干净且可使用的容器上用“绿旗”标注。软管在没有使用时应该用SO₂和柠檬酸进行消毒(见9.7.3),消毒完毕后悬挂排水晾干。软管需要放在倾斜的架子上或悬挂起来以利于排水,而不是直接留在地面上。

各酿酒厂可能会采用不同的清洗抑菌步骤,但确保每一步骤的顺利完成十分重要。清洗抑菌过程需要严格按照进度表执行(见图9.3)。

清洗抑菌进度表 (日期)

设备及工序	过程编号	频率	时间			备注	员工姓名
破碎机 (线 2) 漂洗 洗净 抑菌							
	9.01	每批次后					
	9.02	每 8h					
	9.03	每 8h					
除梗机 (线 2) 漂洗 洗净 抑菌							
	9.01	每批次后					
	9.02	每 8h					
	9.03	每 8h					
压榨机 (#2) 漂洗 洗净 抑菌							
	9.01	每次装料后					
	9.02	每 8h					
	9.03	每 8h					

责任人签字: _____ 监督人签字: _____

图 9.3 清洗消毒表举例

这张表能使酒厂准确地描述执行步骤、频率、所使用的化学品等，确保操作过程有序进行。最后获得结论需要对代表性的清洗面取样，进行微生物和/或消毒剂残留的检测。所有的数据都需要收集整理以备日后检查和对工艺的调整。这些记录不仅是总质量控制的一部分（见第 10 章），也能作为文字记录为以后出现的法律纠纷服务。

对清洗和抑菌的效果需要用最简单的标准形式进行描述（见图 9.3）。这些形式描述了清洗抑菌过程中（时间、频率、温度、所使用化学品类型及浓度等）每一步骤的执行情况。操作员工和监督人需要在每个操作过程签字以确保每一步骤都按照规定完成。



第 10 章 质量关键点体系

10.1 引言

危害分析和关键控制点（HACCP）是一种系统的措施，用来防止、降低或最小化食品污染的风险（Anonymous, 2002）。从本质上，采取该措施可以识别可能存在的问题，确定必须控制的生产关键环节，消除或降低食品安全危害风险至可接受的水平。最初，HACCP 的创建是为了满足 20 世纪 60 年代太空计划中的食品安全要求，现在已经应用到农产品、食品制备和处理、食品加工以及食品服务和分配领域。实际上该方法已经被成功应用于酿酒行业。

尽管以 HACCP 为基础的各种方法经常被用于防止食品微生物危害，但葡萄酒并不存在因摄入病原微生物而使人得病或死亡的风险。因此，HACCP 没有必要应用在葡萄酒生产上。不过基于 HACCP 的方法可用于酿酒以改进生产控制，从而稳定持续地生产高质量的产品。因此酿酒厂应该考虑施行基于常规 HACCP 认证原则的质量关键点体系（QP）。

10.2 QP 方法的发展

在成功开发 QP 程序以前，酿酒厂必须已采用许多其他的规范。这些规范包括含有生产记录（见第 7，8 章）的生产质量管理规范（GMPs）；虫害控制策略（鸟类、昆虫、鳞齿类；杀虫剂使用；虫害管理措施）；维护计划和记录；消毒方案，进程表和记录（见第 9 章）；水质评价和监测记录（见第 9 章）；处理消费者投诉措施（见第 19 章）；员工培训方案；首选供应商以及供应商保证合约（配料规格、种植合约）；库存控制以及产品储存；供应链管理、追踪，并召回或退出市场的政策和程序。

由于设备、生产操作以及员工的不同，每个设备和产品使用的 QP 程序具有独特性。当然，一个简洁的 QP 程序可以为葡萄酒生产过程中所面临的任何问题提供基本的解决方法。根据以下章节的讨论，酿酒员工按照以下常规步骤制定 QP 程序：

- （a）制定一个生产流程或流程图，从原料（葡萄）开始，直到瓶装以及货

- 仓存储（见 10.3）。
- (b) 对每个加工过程进行指导分析，确定每个加工环节中可能存在的质量问题（关键质量点）（见 10.4）。
 - (c) 对每个关键质量点建立关键限制范围（见 10.5）。
 - (d) 建立监控措施以及记录（见 10.6）。
 - (e) 当某一过程超出关键限制范围时采取补救措施（见 10.7）。
 - (f) 建立保存记录和文件的措施（见 10.8）。
 - (g) 制定一个验证方案，表明 QP 程序已经有效实施并且能够检测重要质量因素（见 10.9）。

10.3 工艺设计和操作流程

制定 QP 程序，可从制定“标准”的葡萄酒流程图或图表开始（见图 10.1），由于每个设备的设计以及目标都不同，需要一个更详细的图表来表述各个阶段中所有的步骤，包括葡萄、葡萄汁以及葡萄醪。如果酿酒厂自主进行产品的分配和销售，流程图中也应该包括这些步骤。

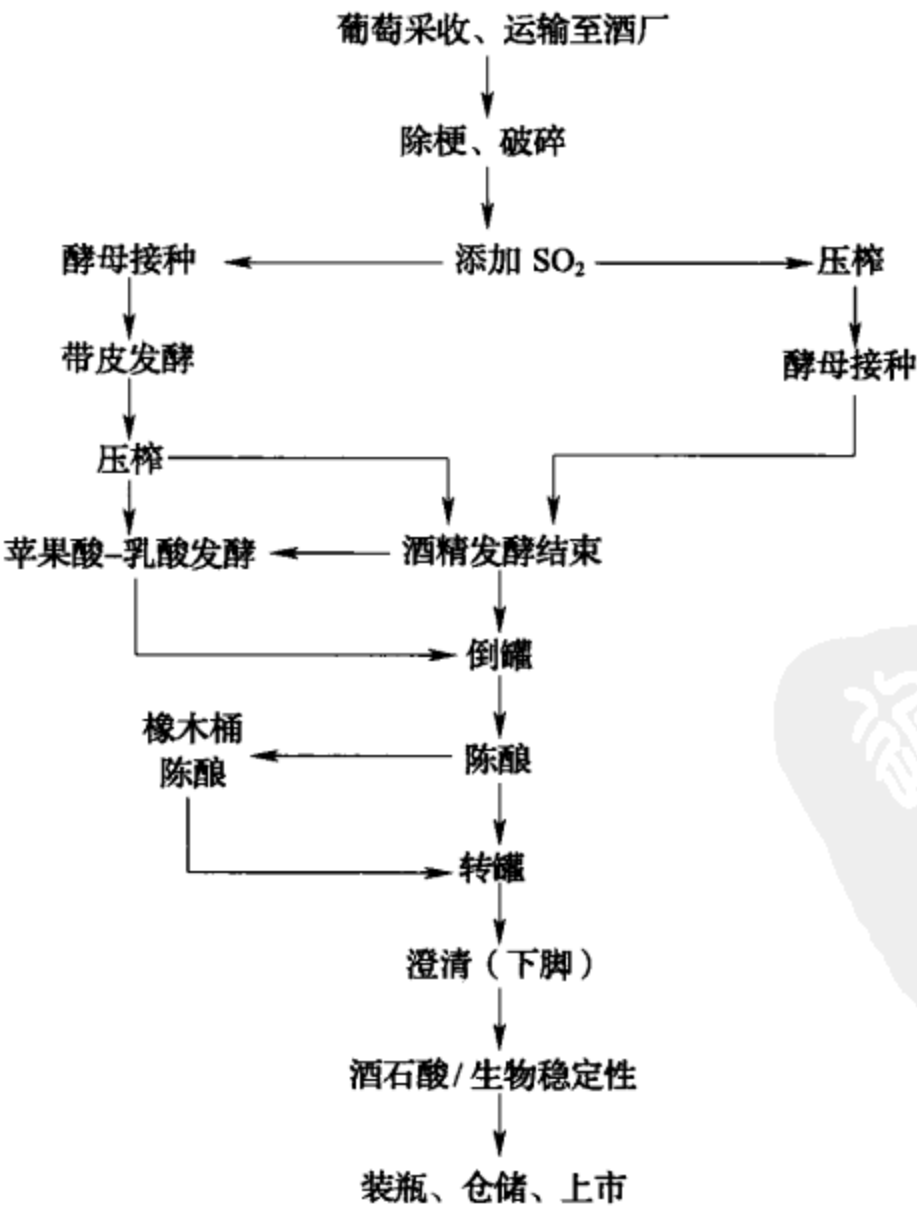


图 10.1 可用于建立质量关键点体系的酿酒流程图，更多的信息需要更详细的流程图

每个QP程序必须包括每个步骤的详细描述(标准),例如可接受的水果质量(糖浓度、可滴定酸、微生物污染程度等)、SO₂(添加时间以及添加量)、压榨时间和压力、葡萄醪澄清过程、酵母接种速率、添加的营养物质含量、发酵温度、接种苹果酸-乳酸菌(有或无),货架编制及数目和/或货架顶部空隙,为提高酒石酸稳定使用的澄清剂、澄清速率、温度、时间,以及提高生物稳定性的方法。

10.4 质量因素分析

在HACCP中,食品安全的危害是指可能发生的某种危害,一位严谨的酿酒师可以根据经验、最佳的工厂实践、工程或科学信息来对这种危害建立控制措施。危害分为三种:(a)生物危害,(b)化学危害,(c)物理危害。类似地,一种质量因素可以被定义为:未进行控制时,可能引起葡萄酒品质产生缺陷的任何一种生物、化学或物理的因素。这种分析要求对某种特定的质量问题发生的可能性进行判断,以及具备较强的科学专业技能和信息、丰富的产品加工、储存以及销售知识。

10.4.1 质量因素案例

尽管葡萄酒生产很少出现实际的生物危害,但许多微生物在不同的酿造阶段仍能引起腐败。这些微生物包括醋酸菌(见11.21)、德克酵母/酒香酵母(见11.2.2)、膜酵母(见11.2.3)、乳酸菌(见11.3)、类酵母(见11.2.4)、结合酵母(见11.2.5)、霉菌以及其他微生物(见第4章)。

化学危害也是酿酒师需要考虑的问题,这类危害可以分为自然发生、有意添加和偶然发生的。自然产生的化合物中有些能对人体健康造成伤害,比如生物胺(见11.3.6)、氨基甲酸乙酯(见11.3.2)、毒枝菌素(见4.5.2)。人为添加的化合物有SO₂(气体,硫黄、焦硫酸钾)、酒石酸、Velcorin™(见5.2.2)、微生物营养组分(磷酸氢二铵以及混合物)。另外无意/有意造成污染的化学物质还包括超过标准的农药残留物、清洁或消毒剂(见第9章),以及因疏忽从仪器上带来的润滑剂。

任何葡萄酒中检测到的外来杂物通常认为具有物理危害性。其中最重要的危害物是瓶装过程中带入的玻璃渣。其他潜在的污染物包括木屑、金属屑、硅藻土、包装材料或瓶装过程中没有清除的软木塞屑。在常规HACCP系统中,并不认为果蝇或植物碎屑等污染物是危害物。但在QP程序中需要控制这些因素,因为这些污染物能对葡萄酒的品质及销售造成负面影响。

10.4.2 预防措施

为了减少有害物的产生和保证稳定的市场销售,需要建立并执行相应的预

防措施。例如酿酒师可以考虑在特殊的葡萄醪预处理或酒精发酵过程中额外添加氮源（见 8.2）。关于氮源的添加浓度很难确定，这是由于不同营养补充物的有效性和何时添加营养物质的信息不一致（酵母接种前或接种后添加以及添加的量）。在这种情况下，当压榨之前葡萄醪中的氮源低于特定浓度时，酿酒员工要采取预防措施。另一个例子是为了减少乳杆菌的污染，而在压榨过程中再添加 SO₂ 及溶菌酶。

10.4.3 关键质量点

关键质量点（CQPs）是指在一些特定的生产环节采取措施来保证产品质量及安全。不同酿酒厂以及同一酿酒厂中不同产品的关键质量点是不同的。除了对某些涉及产品安全的环节进行控制外，CQPs 还需能反映管理层和员工的整体目标以及文化。

一些不同关键质量点和其中特定的微生物问题及相应控制措施见表 10.1。例如，在瓶装的甜型非加强葡萄酒中检测到一个酵母细胞，也足以导致出现二次发酵。在这种情况下需要采取相关的预防措施，以保证灌装线的正确消毒及过滤除菌设备的正常工作。同时需要有额外的措施如添加山梨酸来限制酵母潜在的生长。“围栏技术（hurdle technology）”的观点就是采用一系列预防措施，尽可能减少腐败的产生。这种方法的另一个优点是能够在某种预防措施没能正确执行的情况下，其他措施也能够降低污染的风险。

表 10.1 微生物污染以及与关键质量点相关预防性措施的实例

关键质量点	微生物污染	补救措施
原料采收、 运输	大量的葡萄孢属，腐烂，醋酸菌	改变种植方式，添加 SO ₂ ，拒收发霉葡萄
	发酵迟缓或停滞	调整营养成分，使用正确的酵母活化方案，稀释高糖度的葡萄醪
酒精发酵	感染醋酸菌	降低 pH，添加 SO ₂ 或溶菌酶
	苹果酸 - 乳酸发酵不理想或失败	降低酒精度，提高 pH，检查发酵起始种子液，降低 SO ₂ 浓度
陈酿	形成薄膜或黏液	及时添罐，使用足量 SO ₂ ，无菌过滤
	不良的气味（挥发酸、乙醛、乙酸乙酯、鼠臭味等）	及时添罐，使用足量 SO ₂ ，无菌过滤，避免在甜型葡萄酒中使用山梨酸酯
	酒香酵母含量过高	使用 SO ₂ 或防腐剂 Velcorin™，降低 pH，杀菌过滤器，维持低温窖藏，保持卫生
装瓶	微生物污染	使用 SO ₂ ，无菌过滤

酿酒厂确定 CQPs 策略时,员工需要利用流程图作为起始点,为处理所用的原材料及配料、各阶段中每个步骤的效率、设备、设计中可能的缺陷和贮存及分配条件等制定相应的方案。每个过程和产品都有特定的 CQPs,这取决于酒厂布局、设备流程、使用的配料和消毒程序。

10.5 临界点

临界点 (CL) 是用于衡量过程中特定质量点的客观尺度。一个临界点可能是:(a) 工艺规程;(b) 过程或成品的检测;(c) 简单的是或否的判定。工艺规程中一个典型的例子是发酵温度,因为过高或过低的温度容易造成酒精发酵迟缓或停滞。产品测定中的例子是在葡萄醪中添加氮源,因为氮源的添加取决于酒厂的检测结果(如对酵母可同化氮源的测定)。最后,关于是否判定的例子是在装瓶前判断是否需要无菌过滤。

临界点的建立通常涉及生产过程中产品的检测或某设备操作参数的设定。必须确定及调整具体的临界点或可接受的最大/最小水平。例如,有些能够测定酵母可同化氮源的酒厂已经建立了完成发酵所必需的最低浓度。如果葡萄醪中的实际氮源浓度低于此值,那么酿酒师需要额外添加一定量的氮源。其他临界点可以是葡萄的腐烂程度、糖浓度、温度、时间、pH、酸度(可滴定的和/或挥发的)、过滤的流速或存在的异物。确定 CL 所需的信息来源包括科学出版物、规章准则、专家意见及实验性研究。

10.6 监控过程

监控意味着酒厂需要根据计划执行一系列的检测或分析以评估 CQP 是否在控制范围内。监控过程中需监控的参数(温度、pH、挥发酸、SO₂、感官评价等)包括适当的 CL 及使用的分析方法(温度计、pH 计、挥发酸测定装置、SO₂ 的测定、闻和/或品尝等方法)。另外也需要明确分析的频率、进行测试的人员、监控参数的记录和如何检验监控过程。可采用很多分析方法来测定一个选择的 CL,从而确保生产过程受到控制,可以预防并尽量降低腐败的可能性。很多微生物检测方法能够参照第 12~16 章,化学方法可参考 Ough 和 Amerine (1988)、Zoecklein 等 (1995)。

除了快速准确外,必须考虑监控过程的成本。因此,确定分析的方法、分析的对象以及分析频率,都应考虑经济因素。有时酿酒厂会将酒样送到商业化的分析实验室分析一些自己无法测定的项目。例如 4-乙基苯酚是酒香酵母的指示剂(见 11.2.2),由于这种分析十分昂贵,因此一般只用于分析可疑的样品而不作为常规检测。

一般情况下, CL 会避免进行微生物计数检测, 因为计数过程往往需要几天而不是几小时。微生物计数(见第 14 章)需被纳入消毒过程、GMP 或作为检验的一部分。如果需要执行微生物标准, 推荐采用统一的分析程序, 包括采样、稀释、培养基组成和培养条件。Loureiro 和 Malfeito - Ferreira (2003) 指出酒厂采用的分析方法多变, 使得结果对比十分困难。

10.7 纠正措施

一旦超过了临界点, 采用何种纠正措施就显得十分重要(见表 10.1), 最适宜的方法就是根据可能出现的问题准备一系列可行的纠正措施。例如, 酒瓶未贴上“酒精消费警告”的纠正措施就是贴上正确的标签。

一般情况下, 过程失控的实际原因很难完全确定, 但纠正措施仍然可行。例如, 挥发酸度的突然升高意味着乳杆菌的生长(见 6.6.2 及 11.3)。这种情况下纠正措施包括(a)降低 pH; (b)添加 SO_2 ; (c)利用溶菌酶降低感染。因为很多葡萄醪的 pH 高于 3.8, 添加酒石酸能有效地降低 pH, 同时生成分子态 SO_2 , 使其抑菌作用更有效。在这种情况下使 pH 从 3.8 降低到 3.7, 能大大降低生成 0.5mg/L SO_2 分子所需添加的游离态 SO_2 的量(从 50mg/L 降低至 40mg/L)(见 5.2.1)。

10.8 记录的保留及文件存档

生产记录的保存可确认生产在规定范围内, 并可提供每批次产品的技术资料。如今在商品流通领域, 良好的可追踪的产品记录显得尤为重要, 原料来源控制和分配的良好记录也比以往更为重要。QP 中的校正步骤要求对记录进行评价, 包括关键检测仪器及操作设备的校准记录。

保留一系列监测记录(最好用钢笔记录)是十分重要的, 如操作者所做的记录以及检测的时间。这些记录必须在进入下一流程之前的数日内由监督人评审。从而在频繁的审阅过程中发现生产过程中可能存在的错误进而能及时进行补救纠正。

标签是酒厂涉及 QP 安全程序十分重要的一环。美国联邦法律及其他规定必须标注酒精消费警告标签。因为有些消费者对亚硫酸盐过敏, 当酒中亚硫酸盐含量超过 10mg/L 时需要在标签中注明。另外所有的葡萄酒标签都需要经过管理机构的核准(如美国酒、烟税收与贸易局)。

10.9 验证

除了生产过程的监控外, 验证还包含建立评估安全及质量控制计划的有效

性等内容。例如该程序显示已经执行某一项目，且其在某一生产过程中是有效的。验证包含一系列过程，如监控中仪器及设备的校正、化学测试微生物中有效样品的准确性、分析方法的验证及记录评审方案等。当生产方法及方式发生改变，关键指标发生变化，存贮、销售或产品用途发生变化时需要对质量程序进行验证，因为这些因素的改变都能影响葡萄酒的安全及质量。当第一次应用某个计划时需要进行验证，当质量和安全因素改变时，需对该计划进行评审和修改，之后在下一次收获季节之前再次评审修改过程。

首次采用一个质量程序时，常用“验证”来判定该程序是否被正确应用，并有效地控制已确认的安全和质量因素。事实上，验证是连接开发及执行计划的“纽带”。作为初始执行计划的一部分，将质量控制与现有的卫生消毒措施、生产、存储、采购、配送（包括产品及市场的召回）及员工的培训结合起来具有十分重要的意义。



第 11 章 葡萄酒腐败

11.1 引言

由于微生物污染发生较快并且经常没有任何迹象，早期判断可能的腐败问题对正确执行补救措施非常关键。然而，确定污染源以及进行正确的补救并不容易，因为一种微生物能引起多种腐败问题，而且一种特定的葡萄酒腐败可能是由多种不同的微生物引起的。本章概括介绍了腐败的微生物、对它们的控制以及主要葡萄酒腐败问题产生的原因。

11.2 腐败微生物

11.2.1 醋杆菌 (*Acetobacter*)

控制葡萄酒中的醋杆菌，首先要控制进入酿酒厂时水果表面的微生物数量，并保持合适的清洗消毒程序（见第 9 章）。因为霉菌污染的水果比正常水果中含有更多的醋酸菌（见 6.5.1），使用霉菌污染的水果会增加发酵后贮藏时醋杆菌的污染。因此，可以选择符合质量标准的优质水果来降低交叉污染的风险。

控制水果的质量是酿酒厂防止微生物污染的第一道措施，现场采取的措施对一些未预料到的菌种污染及增殖控制起到关键作用。由于醋杆菌是绝对好氧菌（见第 3 章），减少桶顶空间以及限制氧的供应是一项重要的控制措施（见 8.7.1）。也可以添加 SO_2 ，但是所需的浓度应依据污染的菌种以及酒的 pH 而定（Du Toit 和 Pretorius, 2002；Du Toit 等, 2005）。上述作者推荐当分子态 SO_2 浓度达到 $0.7 \sim 1 \text{ mg/L}$ 时就足以抑制所有的醋杆菌和葡糖酸醋杆菌。因为葡萄酒中巴氏醋杆菌甚至可在含有 SO_2 的厌氧状态下生存（Du Toit 等, 2005），限制 O_2 和使用 SO_2 必须和其他操作工序配合使用，包括果汁的澄清来物理除菌，降低 pH，提高酵母的接种量，发酵前添加 SO_2 ，合适的温度，地窖的清洁（Du Toit 和 Pretorius, 2002；Du Toit 等, 2005）。Joyeux 等（1984b）指出在桶贮存过程中，维持地窖温度在 $10 \sim 15^\circ\text{C}$ ，可作为另一种限制微生物蔓延的重要手段。

尽管酿酒师尽职尽责，但葡萄酒的污染和腐败还是时有发生。尤其在大桶

库存的工厂中,倒桶时由于个别桶没及时消毒造成酒的污染经常发生。尽管污染的桶应尽快远离生产区域,但根据污染程度有些桶消毒后可再使用。Wilker和 Dharmadhikari (1997) 对感染醋酸菌的木桶的四种消毒方法进行比较:(a) 氯气 (pH 7.0; 250mg/L, 24h); (b) SO_2 (pH3.0, 250mg/L, 24h); (c) 碱和 SO_2 结合使用,在 1.25g/L 的碳酸钾中浸泡 24h,然后用 300mg/L 的 SO_2 漂洗; (d) 热水 (开始 85℃,升到 88℃ 保持 20min)。将易受污染的葡萄酒在处理过的桶中贮存 92d,用热水处理过的木桶是唯一没有再受醋杆菌感染 ($< 10\text{CFU/mL}$) 的。除了热水外也可以使用臭氧进行消毒 (见 9.7.7)。

一般来说,瓶装葡萄酒中低浓度的氧可以抑制醋杆菌的二次生长及其引起的腐败。但是 Bartowsky 等 (2003) 描述了一种异常情况,就是醋酸菌也可以使瓶装酒变质。此时,未经过滤的酒是正置的,这种变质被认为是足够氧的渗入促使了细菌的生长。

11.2.2 德克酵母/酒香酵母 (*Dekkera/Brettanomyces*)

有许多感官词汇用来描述受德克酵母/酒香酵母污染的葡萄酒,从“苹果汁味”、“丁香味”、“辛辣味”、“烟熏味”、“皮革味”、“雪松味”、“药材味”、“创可贴味”、“鼠臭味”、“马厩味”、“湿羊毛味”甚至“污水气味”。这些气味都是由于生成了大量的挥发性物质,包括 4-乙基愈创木酚和 4-乙基苯酚 (Fugelsang 等, 1993; Licker 等, 1999)。4-乙基愈创木酚的感官描述为“丁香”或“辛辣味”,4-乙基苯酚有“烟草味”或“药材味”。由于污染葡萄酒的感官描述上存在较大差异,也许存在更多感官中性的德克酵母/酒香酵母,使用这样的菌种可能在不影响风味的条件下改善酒的质量。

酒香酵母的感官影响依据葡萄酒以及酿酒师和消费者的情况而定。例如 Loureiro 和 Malfeito - Ferreira (2003) 发现有些消费者对酒中 4-乙基苯酚超过 $620\mu\text{g/L}$ 时的感觉难以接受,但另外一些消费者则不同。当 4-乙基苯酚的浓度不到 $400\mu\text{g/L}$ 时,作者认为这种化合物赋予葡萄酒复杂的气味如“香料味”、“皮革味”、“烟草味”。相反, Licker 等 (1999) 认为酒香酵母污染度高的葡萄酒中 4-乙基苯酚的含量达到 $3000\mu\text{g/L}$,而中度污染的葡萄酒中含量为 $1700\mu\text{g/L}$,未污染的葡萄酒中 4-乙基苯酚的含量也有 $690\mu\text{g/L}$ 。挥发性酚类的产生随着酒香酵母菌种的改变而变化,正如 Fugelsang 和 Zoecklein (2003) 报道的一株菌能合成 $120\mu\text{g/L}$ 4-乙基愈创木酚和 $440\mu\text{g/L}$ 4-乙基苯酚,而另一菌株的产量却低于 $10\mu\text{g/L}$ 。

从生化途径看,4-乙基愈创木酚和 4-乙基苯酚分别来源于阿魏酸和香豆酸。该途径包括两步反应,首先是在肉桂酸脱羧酶的作用下羟基桂皮酸脱羧基,然后在乙烯基苯酚还原酶的催化下将乙烯基苯酚中间产物还原 (见图 11.1)。尽管涉及的具体辅酶还不清楚,但酒香酵母的第二步还原反应受益于 NADH 的再

氧化。在低氧条件下， NAD^+ 的生成受到限制，从而导致碳水化合物的代谢受到抑制。由乙烯基苯酚还原为乙基苯酚能够使细胞增加 NAD^+ 的生成以维持代谢的正常进行。

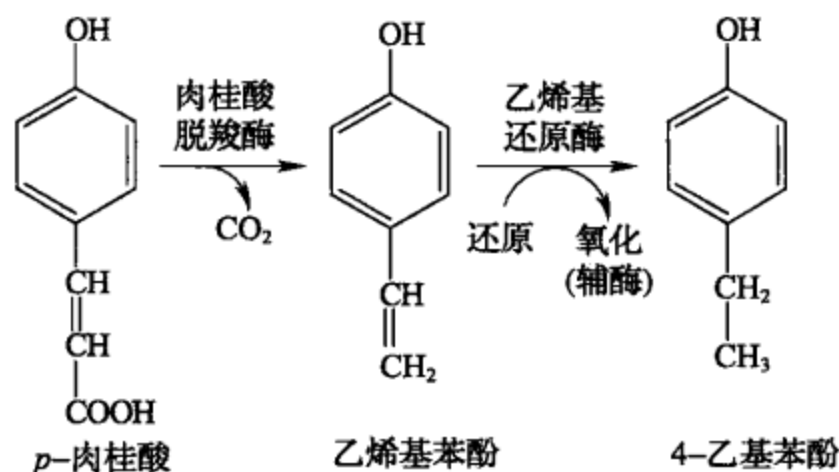


图 11.1 从羟基桂皮酸生成挥发性酚类物质 [化学工业学会版权, 摘自 Chatonnet 等 (1992)]

尽管许多酿酒微生物，如醋杆菌、酒明串珠菌、希氏乳杆菌、植物乳杆菌、短乳杆菌、戊糖片球菌、有害片球菌和酵母能够从阿魏酸和香豆酸分别合成 4-乙烯基愈创木酚或 4-乙烯基苯酚，但大部分微生物不能将乙烯中间产物还原为 4-乙基愈创木酚或 4-乙基苯酚 (Chatonnet 等, 1992; 1995; Shinohara 等, 2000)。因此，从理论上讲，酒香酵母能够将其他酿酒微生物合成的乙烯基苯酚还原，因此受益于其他微生物的生长 (如乳酸菌)。Dias 等 (2003b) 年发现酒香酵母在没有香豆酸的情况下能够利用 4-乙烯基苯酚作为前体合成 4-乙基苯酚。

由于只有酒香酵母能产生大量的乙基酚类物质，酿酒厂曾试图使用 4-乙基苯酚作为一种标志来检测酒香酵母的感染程度。然而，乙基酚的合成随着菌种的不同而有差异 (Fugelsang 和 Zoecklein, 2003)，也有报道认为有些乳酸菌，比如有名的植物乳杆菌 (Chatonnet 等, 1992, 1995; Cavin 等, 1993) 以及季也蒙毕赤酵母 (Dias 等, 2003a) 也能产生少量的乙基酚。由于这些原因，直接根据物质浓度估算活细胞量是很困难的。

目前使用的处理方法就是在感染了酒香酵母后从葡萄酒中除去 4-乙基愈创木酚和 4-乙基苯酚。例如，Ugarte 等 (2005) 指出将反渗透同吸附系统结合使用，从酒中成功除去了这些挥发性酚类。或许 Chassagne 等 (2005) 提出的方法更简单，使用酵母酒脚除去葡萄酒中挥发性酚类。同活性干酵母相比，作者指出发酵得到的酵母酒脚除去 4-乙基苯酚的能力较强。吸附这些挥发性酚类的能力根据酒的状况而定，尤其是 pH、温度和酒精度。

除了挥发性酚类，酒香酵母还能合成大量的风味物质，许多还没有被检测到 (Licker 等, 1999)。比如酒香酵母能合成异戊酸，一种具有“腐臭味”的挥发性物质 (Wang, 1995; Licker 等, 1999)。此外，一些菌株能够合成各种含氮化合物而使酒产生“鼠臭”的不良气味。

在酿酒期间控制酒香酵母的生长并非易事。Spoholz (1993) 指出这种酵母能够耐受较高的 SO_2 ，推荐使用 100mg/L 的总 SO_2 或 30 ~ 50mg/L 的游离 SO_2 来进行控制。

维持 0.4 ~ 0.6mg/L 的分子态 SO_2 能有效控制污染菌的生长。Du Toit 等 (2005) 曾提出酒香酵母在 SO_2 存在的情况下，或许进入一种“存活但无法培养”的状态 (见 6.1)。因此这种酵母就能在装瓶之前逃脱常规微生物检测方法 (如平板培养)，在条件合适的情况下就可能在贮存过程中大量“繁殖”。

其他的控制措施还包括澄清和过滤 (见 5.3)，以及最近研究的碳酸二甲酯 (见 5.2.2)。尽管此项研究看似具有良好的前景 (25mg/L 的碳酸二甲酯，可抑制酒香酵母)，但 Daudt 和 Ough (1980) 仅使用了一种培养基 (菌种未见报道)。另外，尽管 Ough 等 (1988) 报道过 DMDC 和 SO_2 联合使用抑制酒香酵母的协同作用，但该方法还未被开发利用。另一种方法就是控制温度，地窖温度降低至 13℃ 以下，也能够减缓酒香酵母的生长。酵母的耐热性也曾被报道过 (Couto 等, 2005)。

一旦木桶感染这些酵母，由于其物理特性，消灭这些酵母就很困难。与不锈钢或玻璃不同，木桶的内壁有许多不规则的裂缝和罅隙，一些微生物包括酵母能在其内生存，因此难于清理。

11.2.3 膜酵母 (Film Yeasts)

该类酵母具有氧化活性，能形成一层薄膜，有时也称之为“菌膜”。该薄膜的形成是由于酵母母体和子体不断进行出芽繁殖，但母体和子体不分开相互连接成链呈分支状态分布，最后覆盖在酒的表面 (见 1.2.2.4)。刚开始，这些酵母看起来像漂浮的“花”，但在生长条件允许的情况下，这些酵母迅速繁殖形成一层厚的膜，看起来像“霉菌”。Baldwin (1993) 描述这种薄膜像一种白垩状或丝状的白色物质，干燥的时候看起来像布满“灰尘”似的。葡萄酒假丝酵母 (*Candida vini*，以前称之为 *Candida mycoderma*) 是一种相对普遍的能够形成厚膜的膜酵母。除了能够形成薄膜，这些酵母也能够合成风味物质，比如乙酸乙酯和羟基丁酮等 (Clemente - Jimenez 等, 2004)。

某些非酿酒酵母形成的薄膜反映了氧化活性的变化，最有效的措施就是保持罐和桶顶部没有空隙，这样可以除去酵母生长需要的氧。Baldwin (1993) 建议酿酒桶中加入干冰，然后释放出 CO_2 来限制氧的进入。因为有些非酿酒酵母，比如膜醭毕赤氏酵母 (*Pichia membranefaciens*) 和克鲁斯假丝酵母 (*Candida krusei*) 对高于 3mg/L 的 SO_2 仍有抵抗力，因此在木桶中一旦形成了薄膜，单依靠 SO_2 是起不到作用的 (Thomas 和 Davenport, 1985)。另外，膜酵母最重要的代谢产物之一乙醛能有效地与 SO_2 结合，从而降低 SO_2 的杀菌效果 (见 5.2.1)。一些酿酒师将几克偏重亚硫酸钾放到一个小的塑料培养皿中，漂浮在酒的表面，能

成功抑制膜酵母 (Baldwin, 1993)。

采用较低的地窖温度 ($<15^{\circ}\text{C}$) 能够减缓膜酵母的生长, 因为酒精度和温度能够协同抑制酵母生长。Dittrich (1977) 报道 10% ~ 12% 酒度的葡萄酒在 8 ~ 12 $^{\circ}\text{C}$ 贮存时, 膜酵母未生长, 而酒度提高到 14% 且在相对高的温度下, 葡萄酒中有膜酵母的生长。

11.2.4 类酵母 (*Saccharomycodes*)

路德类酵母被称为酿酒师的“噩梦”, 因为这种酵母对 SO_2 的抵抗力大约是普通酵母的 5 倍 (Stratford 等, 1987)。Ciani 和 Maccarelli (1998) 猜测这种酵母非同寻常的抵抗力可能跟它能产生高浓度乙醛的能力有关, 而乙醛又能够结合 SO_2 。因此众所周知的控制办法就是无菌过滤 (见 5.3)。幸运的是, 这种酵母在桶中陈酿或瓶装酒中很少见到, 可能是由于其生长慢或是同其他酵母竞争力差的原因造成的 (Fleet, 2003)。

这种酵母由于产生浑浊物或是沉淀物以及不良风味而损害葡萄酒的品质 (Du Toit 和 Pretorius, 2000; Loureiro 和 Malfeito - Ferreira, 2003)。Ciani 和 Maccarelli (1998) 研究了葡萄醪中 27 种不同的酵母菌种, 发现这些酵母产生高浓度的乙醛 (46.7 ~ 124mg/L)、3 - 甲基丁酮 (211 - 478mg/L) 和乙酸乙酯 (141 ~ 540mg/L)。

11.2.5 接合酵母 (*Zygosaccharomyces*)

接合酵母也能在酒精发酵后引起污染。这种酵母通过产生气体、浑浊物、沉淀物而破坏瓶装的葡萄酒 (Loureiro 和 Malfeito - Ferreira, 2003)。其他的产物, 如琥珀酸、乙酸、乳酸, 也有报道能合成乙醛和丙三醇 (Rankine, 1967; Oura, 1977; Zeeman 等, 1982; Nykanen, 1986; Herraiz 等, 1990; Moreno 等, 1991; Mateo 等, 1992; Lema 等, 1996)。Thomas (1993) 证实, 即使在酒瓶中仅存在一个活的接合酵母细胞如拜尔接合酵母 (*Z. bailii*), 也足以引起酒的腐败。

接合酵母能够耐受高渗透压, 对乙醇、 SO_2 、吸附剂以及其他一些常用的防腐剂都具有抵抗力。一些菌种即使在 2.5 $^{\circ}\text{C}$ 的低温条件下仍能生长 (Warth, 1985; Thomas, 1993)。在酒精发酵前为提高葡萄汁中的糖浓度或装瓶前改善酒的甜度常添加浓缩葡萄汁, 而受污染的浓缩葡萄汁可能会使葡萄酒感染接合酵母。在低温贮藏的条件下, 微生物能够以不易觉察的缓慢速率生长。在运输过程中温度过高和/或一些化学变化都会引起这些曾被抑制的微生物的大量繁殖。

在酒厂装瓶卫生条件较差的情况下, 这种酵母也能够引发大问题。例如在装瓶时, 化学消毒剂剂量的不足, 或者热蒸汽的时间和温度没有达到杀灭细胞

的要求，经常引起产品的污染。酿酒厂一旦感染这种酵母，由于酵母本身的特性，很难再清除掉。Rankine 和 Pilone（1993）报道一种特殊的情况，在无菌过滤器的压力计上发现一定数量的接合酵母，存在再次污染瓶装甜型葡萄酒的可能。在这种情况下，压力计的构造会造成此处的大量接合酵母未被蒸汽杀灭。

11.3 葡萄酒缺陷

11.3.1 挥发酸

尽管在葡萄酒中存在一定量的乙酸很正常，但感官上察觉到的挥发酸并不仅仅是乙酸。例如，有些乳酸菌与醋酸菌产生的挥发性酸在感官上存在差异。醋酸菌产生的挥发性酸经常被认为是乙酸和乙酸乙酯的复合物。而对于乳酸菌，乙酸乙酯含量很低或几乎不存在（Henick - Kling, 1993）。

因为乙酸乙酯具有“挥发性特征”或“酸味”，一些酿酒师认为应该把乙酸乙酯而不是乙酸作为葡萄酒腐败的合理指标。乙酸乙酯在葡萄酒中含量范围很大，< 10mg/L ~ > 1200mg/L（Drysdale 和 Fleet, 1989b; Vianna 和 Ebeler, 2001; Rojas 等, 2003; Peinado 等, 2004; Mamede 等, 2005），并且乙酸乙酯的感官描述为“airplane glue”或“fingernail polish remover”的气味。

对乙酸乙酯的含量没有法律性的限制，但规定了乙酸的浓度（见表 11.1）。在美国，根据葡萄酒的类型，葡萄酒中乙酸的最大限量在 0.9 ~ 1.7g/L。当乙酸超过规定水平时，可采用一些处理措施（见 8.7.2）。

表 11.1	葡萄酒中以乙酸计的挥发酸的法定限制			单位: g/L
葡萄品种	美国	加拿大	欧盟 ^a	
佐餐酒（红）	1.40	1.20	1.20	
佐餐酒（白）	1.20	1.10	1.08	
甜酒（红） ^b	1.70			
甜酒（白） ^b	1.50			
出口酒	0.90			

注：a. 欧盟各个地区的最大含量规定不同；b. 由 >28°Bx 的葡萄汁酿造的葡萄酒。

乙酸不仅能对感官产生潜在的影响，而且还能抑制酵母（Doores, 1993），包括影响酵母的生长和发酵能力（Pampulha 和 Loureiro, 1989; Ramos 和 Madeira - Lopes, 1990; Kalathenos 等, 1995; Edwards 等, 1999a）。Rasmussen 等在发酵中途加入 4g/L 乙酸，糖利用率显著降低。事实上，某些乳杆菌减缓酒精发酵，可能是生成了乙酸（见 6.6.2）。例如在葡萄酒中异型发酵菌种 *L. kunkeei* 能产生 3 ~ 5g/L 乙酸（Huang 等, 1996; Edwards 等, 1999a）。

11.3.2 氨基甲酸乙酯 (EC)

不仅在大量的发酵食品如苹果酒、啤酒、面包、橄榄、清酒、酱油、葡萄酒以及酸奶中发现 EC (尿烷)，而且在一些非发酵食品像橘子汁和葡萄汁中也含有 EC (Ough, 1976; Canas 等, 1989)。大家关注氨基甲酸乙酯，因为它是一种疑似致癌物 (Zimmerli 和 Schlatter, 1991)。尽管生成的 EC 量很低，但它在葡萄酒中的含量必须服从国际上的规定，并且需严格控制。目前，美国葡萄酒行业已经建立了一种限制性规定，佐餐葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量小于 $15\mu\text{g/L}$ ，甜型葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量小于 $60\mu\text{g/L}$ 。

精氨酸代谢产生的尿素和瓜氨酸是形成氨基甲酸乙酯的前体物质 (见图 11.2)。在尿素的利用方面，不同酵母在发酵期间摄取和排出尿素的能力存在差异 (Ough 等, 1991; An 和 Ough, 1993)。因为这一原因，添加尿素作为酵母的一种氮源不再合法 (Kodama 等, 1994)。尽管 *N*-氨基甲酰氨基酸也能作为前体物质 (Ough 等, 1988b)，它们在葡萄酒中的含量非常低，或许不能够形成氨基甲酸乙酯 (Huang 和 Ough, 1993)。碳酸二甲酯是一种强效的杀菌化合物，曾在葡萄酒行业中使用，但这种添加剂理论上能够和氨反应产生氨基甲酸乙酯，在美国已经禁止使用 (见图 11.3)。

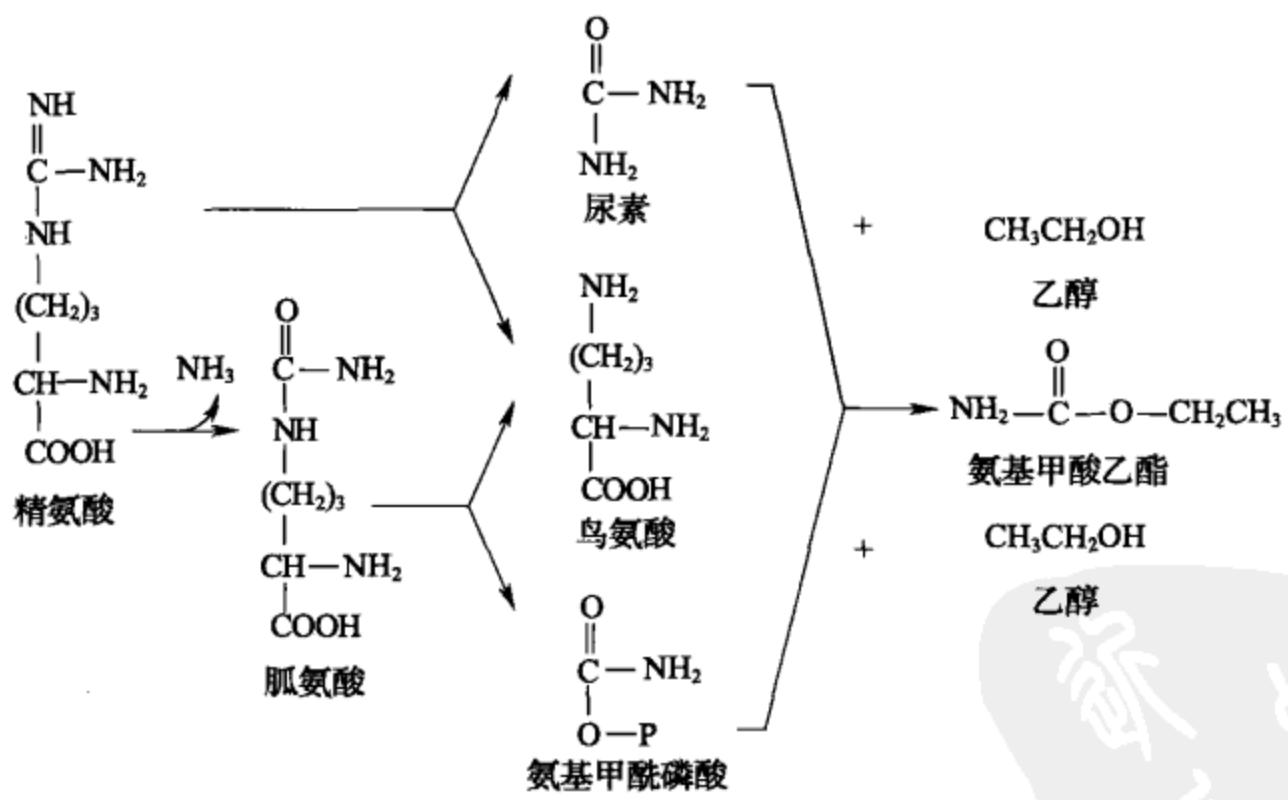


图 11.2 精氨酸或尿素代谢生成氨基甲酸乙酯途径
[摘自 Ough (1976) 和 Ribéreau - Gayon 等, 2000]

在酵母中，大部分精氨酸转化为鸟氨酸和尿素，而不是氨基甲酰磷酸 (Ough 等, 1988c)。相反地，瓜氨酸是乳酸菌降解精氨酸的一种主要产物 (见 2.4.2)。已经发现酒酒球菌和布氏乳杆菌能分泌瓜氨酸和氨基甲酰磷酸 (Liu 等, 1994; Mirade Orduña 等, 2000, 2001)。尽管这些细菌能够合成必需的前体

物质, 但 Tegmo - larsson 等 (1989) 报道苹果酸 - 乳酸发酵并不影响氨基甲酸乙酯在葡萄酒中的浓度。然而最近研究 (Uthurry 等, 2006) 表明一些乳酸菌, 具体指酒酒球菌和希氏乳杆菌能够促进氨基甲酸乙酯的形成。

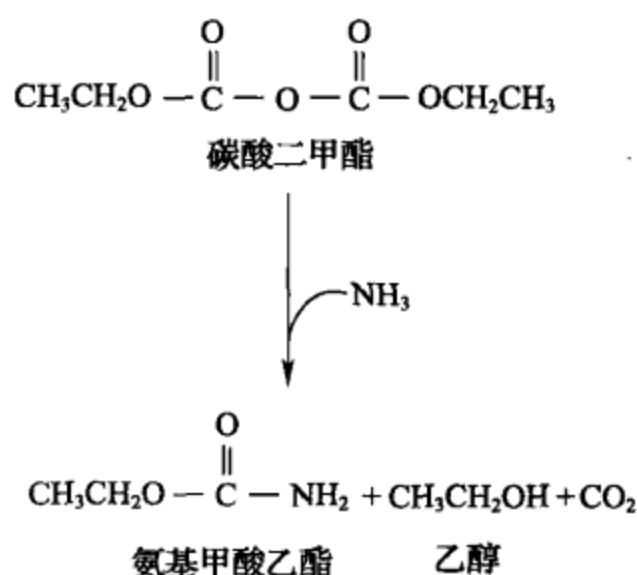


图 11.3 碳酸二甲酯与氨水反应生成氨基甲酸乙酯、乙醇和 CO_2 [摘自 Ough 等 (1988b)]

尽管许多因素能够影响葡萄酒中氨基甲酸乙酯的形成, 但是有些通用的方法可以抑制其形成。例如, 在葡萄园中施加过量的氮肥会导致葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量的增加 (Ough 等, 1989b)。另外, 有些人强烈建议使用不能利用精氨酸或产生尿素的酵母或苹果酸 - 乳酸菌 (Ough 等, 1988c; 1991; Mira de Orduña 等, 2001)。Ough 和 Trioli (1988) 已经成功开发了一种新的方法, 在发酵后处理中加入发酵乳杆菌产生的酸性脲酶除去尿素。氨基甲酸乙酯的形成随着储存温度的升高呈指数递增 (Stevens 和 Ough, 1993), 因此葡萄酒在储存和/或运输时不应置于高温环境。

11.3.3 鼠臭味

一些异型发酵乳杆菌 (短乳杆菌、希氏乳杆菌和纤维二糖乳杆菌) 以及酒香酵母的生长会使葡萄酒中产生“鼠臭味” (Heresztyn, 1986; Grbin 和 Henschke, 2000; Costello 等, 2001)。这种污染的特点是产生一种令人不愉快的气味, 这种气味使人想起鼠笼垃圾以及明显挥之不去的余味 (Costello 和 Henschke, 2002)。根据 Sponholz (1993) 的说法, 取一点具有鼠臭味的葡萄酒在手指之间摩擦, 这种不愉快的气味更明显。

在 Craig 和 Heresztyn 的报告中首次指出, 2 - 乙基 - 3, 4, 5, 6 - 吡啶或许与这种污染有关, 但他们在具有“鼠臭味”的葡萄酒中并没有检测到该物质。最近, Costello 和 Henschke (2002) 指出 2 - 乙基四氢吡啶、2 - 乙酰基 - 1 - 吡咯啉和 2 - 乙酰基四氢吡啶均与这种污染有关 (见图 11.4)。

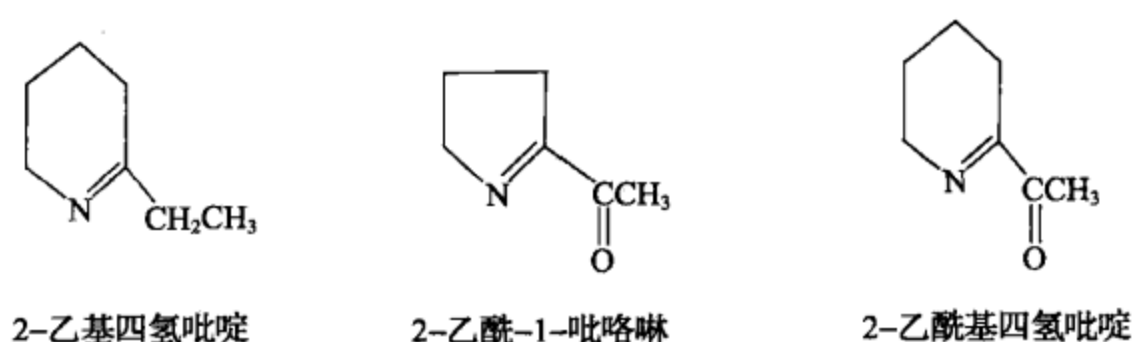


图 11.4 葡萄酒中形成鼠臭味的相关物质

这种污染主要发生在葡萄酒中而不是葡萄醪中，因为这些化合物的合成需要乙醇（Heresztyn, 1986）。由于这种化合物的阈值非常低，只有 $1.6\mu\text{g/L}$ （Riesen, 1992），少量细菌的生长很可能就会破坏整瓶酒。Sponholz（1993）指出这种鼠臭污染并不是一种常见的现象，但 SO_2 含量不足的低酸葡萄酒更容易受污染。Lay（2003）报道说在有赖氨酸或磷酸铵存在下，不管是有氧还是厌氧，酒香酵母在不同的生长条件均能形成一种典型的鼠臭味。

11.3.4 苹果酸 - 乳酸发酵后细菌的生长

当 L - 苹果酸具有一定可利用的水平，并且存在一定生存能力的细菌时，葡萄酒中微生物极易繁殖生长，从而导致瓶装酒的腐败。例如基于纸层析法对苹果酸的检测报道，葡萄酒中酒球菌或片球菌的持续生长，意味着完全的苹果酸 - 乳酸发酵（Wibowo 等, 1988；Edwards 等, 1994）。用纸层析法（见 15.4.9）测定苹果酸的检测限较高（ $100 \sim 200\text{mg/L}$ ），酿酒师认为这种浓度高于葡萄酒稳定的水平。Fugelsang 和 Zoechlein（1993）进行的一项调查表明，大部分被调查的酿酒师（66%）认为 L - 苹果酸的浓度在 $< 15\text{mg/L}$ 时表示苹果酸 - 乳酸发酵完成。剩余的 34% 认为 $< 30\text{mg/L}$ 的 L - 苹果酸可以抑制细菌的再生长，从而“稳定”葡萄酒。一个能接受的浓度依赖于葡萄酒固有的化学指标（pH、总 SO_2 浓度以及乙醇含量），以及酿酒厂对酒瓶灭菌的效果。

一种二次污染的特别例子就是由食果糖乳杆菌（以前称之为发状乳杆菌）引发的。这种细菌对乙醇具有非同一般的耐受力，曾经有人从高酒精度的甜型葡萄酒中（20%，体积分数）分离到该菌（Fornachon 等, 1949；Gini 和 Vaughn, 1962）。从表观上看，这种细菌在瓶装葡萄酒中以菌丝体生长，因此也被称之为“棉杆菌”（cottony bacillus）。随着现代酿酒技术的进展，尤其是 SO_2 的使用以及卫生消毒意识的加强，这种污染事件发生的频率已大幅下降。根据 Kunkee（1996）的报道，由于 SO_2 使用量的降低，在葡萄牙一个酒窖的橡木桶中再次发现该微生物的生长。

为了抑制该细菌的再次生长，当 pH 增加到 3.5 以上时，酿酒师应该考虑倒罐、 SO_2 的添加和增酸作用。因此，应该加入酒石酸加以调整，不能加入苹果酸或柠檬酸，它们会为细菌提供碳源。虽然柠檬酸的成本比较低，但不应该用于

葡萄酒中，除非在双乙酰过量的情况下，此时必须在无菌灌装前立即加入。

11.3.5 天竺葵的气/味

山梨酸是一种短链的不饱和脂肪酸，一般用来作为抑制甜型葡萄酒中酵母的一种化学防腐剂（见 5.2.4），但对乳酸菌没有抑制作用。事实上，一些菌种能够还原山梨酸为山梨醇，山梨醇在葡萄酒 pH 的条件下经过异构化变成 3，5 - 己二烯 - 2 - 醇（见图 11.5），然后同乙醇反应，生成 2 - 乙氧基 - 3，5 - 己二烯（Crowell 和 Guymon, 1975），这种化合物给人一种“磨碎的天竺葵叶子”的味道，并且它的最高阈值大概在 100ng/L 左右（Riesen, 1992）。早期德国术语对于这种气味描述为“geranienton”、“天竺葵味”，并且这种气味不能同香叶醇相混淆，它是一些葡萄品种中重要的单萜化合物。

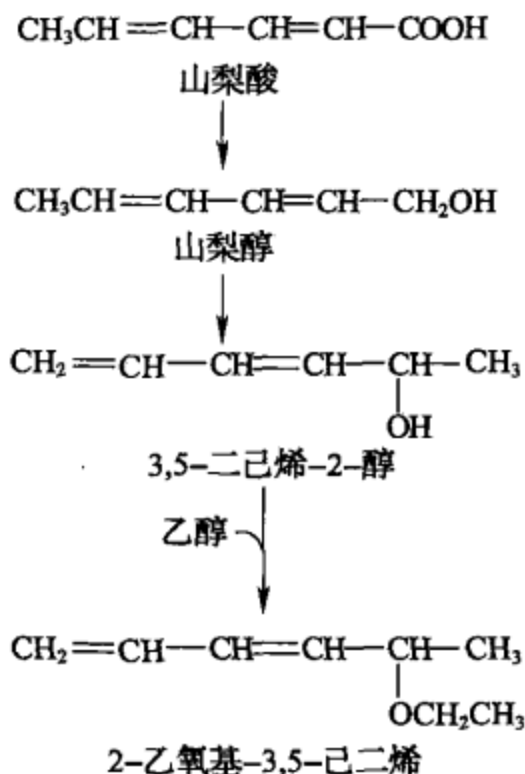


图 11.5 微生物形成“天竺葵”气味的过程

Edinger 和 Splittstoesser（1986）报道说，除了片球菌和乳杆菌外，所研究的所有酒酒球菌都能还原山梨酸为山梨醇。基于这些发现，希望加入山梨酸酯来稳定葡萄汁以延长贮存期的酿酒师应该考虑酒酒球菌存在的可能性。对细菌的生长没有采取限制措施（如加入 SO₂ 或无菌过滤）的情况下，山梨酸的还原产物可能会融入酒中，通过异构化，与乙醇酯化，就会产生“天竺葵”的气味。为了尽可能地减少此类问题，甜型葡萄酒在使用前应该澄清、过滤、亚硫酸化以及在低温下储存。

11.3.6 生物胺

生物胺是氨基酸通过某些乳酸菌的脱羧作用而形成的。因此这种化合物在各种发酵食品如奶酪、干香肠、泡菜、豆面酱以及酱油中经常可以发现（Strat-

ton 等, 1991; Lonvaud - Funel, 2001)。在葡萄酒中检测到组胺、酪胺、腐胺、尸胺、苯乙胺以及其他胺类 (Zee 等, 1983; Baucom 等, 1986; Ough 等, 1987; Vidal - Carou 等, 1991; Bauza 等, 1995; Soufleros 等, 1998; Arena 和 Manca de Nadra, 2001; Moreno - Arribas 等, 2003)。组氨酸和鸟氨酸脱羧后分别形成组胺和腐胺, 如图 11.6 所示。腐胺是由鸟氨酸脱羧而来, 而鸟氨酸又来自于精氨酸 (见图 11.6)。但在另一条代谢途径中, 精氨酸首先脱羧产生精胺, 然后精胺分解为尿素和腐胺。但是在乳酸菌中缺乏这条旁路代谢途径的证据 (Moreno - Arribas 等, 2003)。

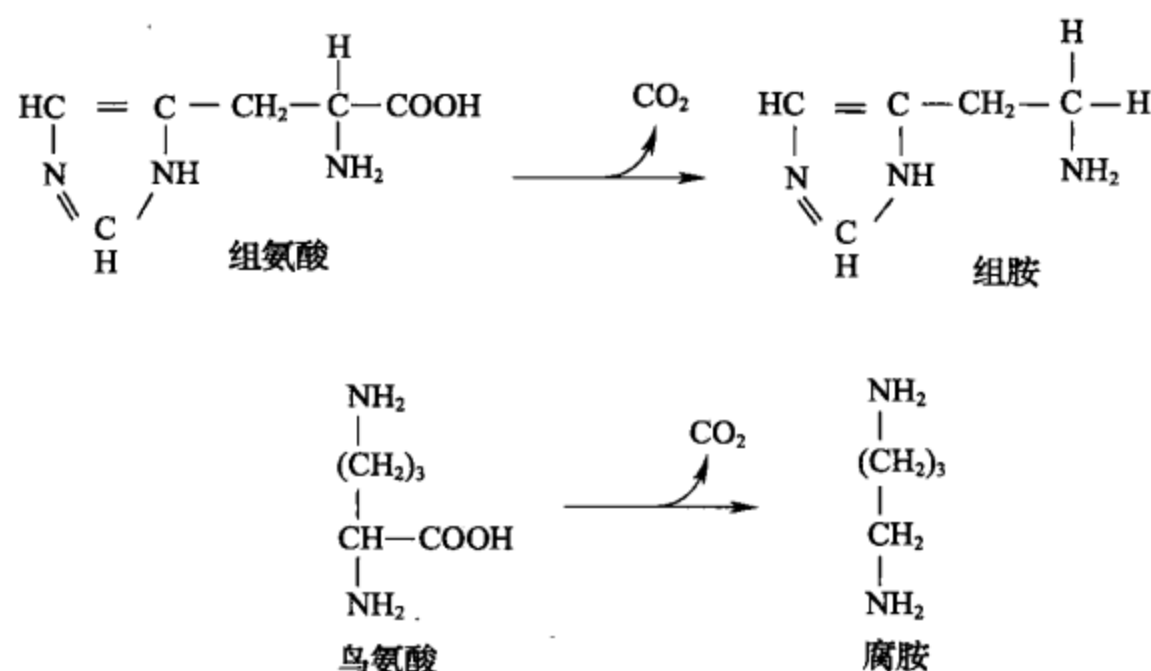


图 11.6 组氨酸及鸟氨酸生成组胺及腐胺的过程

从健康的角度看, 摄取含有过量生物胺的食品能引发头痛以及其他症状 (Rivas - Gonzalo 等, 1983; Jarisch 和 Wantkle, 1996; Silla Santos, 1996)。然而 Ough (1971) 报道说加利福尼亚州的苹果、甜食以及佐餐葡萄酒中的组氨酸含量平均为 2.39mg/L, 这种浓度低于能够引起头痛的浓度 (8mg/L)。Glòria 等 (1998) 和 Soufleros 等 (1998) 指出, 来自俄勒冈州和波尔多的葡萄酒中含有较高浓度的胺类物质。目前美国对葡萄酒中生物胺的含量还未作规定。鉴于其他葡萄酒生产地区 (欧盟) 逐渐加强规定, 美国迟早会限制葡萄酒中生物胺的含量, 以规范一些不符合规定的厂家。

Soufleros 等 (1998) 指出生物胺在苹果酸 - 乳酸发酵期间及其之后由前体物质氨基酸生成。片球菌和乳杆菌等腐败微生物也涉及生物胺的形成 (Delfini, 1989; Moreno - Arribas 等, 2000, 2003; Arena 和 Manca de Nadra, 2001), 然而用于酒精发酵的酵母或许对生物胺的产生有影响 (Goñi 和 Azpilicueta, 2001)。有些人发现只有酒酒球菌能够产生这些生物胺 (Coton 等, 1998)。很清楚, 一个属的所有菌种并不都能产生生物胺 (Lonvaud - Funel, 2001)。例如, Lonvaud - Funel 和 Joyeaux (1994) 发现一株酒酒球菌能够产生这些生物胺, 但

Moreno - Arribas 等 (2003) 在其他 5 株菌中没有检测到这类产物。为了限制生物胺的合成, Lonvaud - Funel (2001) 建议使用不具有氨基酸脱羧作用的苹果酸 - 乳酸发酵菌种。

11.3.7 丙烯醛

一些乳酸菌能够代谢甘油形成 3 - 羟基丙醛 (3 - HPA), 这种化合物或者被还原成 1, 3 - 丙二醇, 或者氧化成 3 - 羟基丙酸, 也有少部分经过化学脱水作用形成丙烯醛 (Sobolov 和 Smiley, 1960; Kandler, 1983; Slininger 等, 1983; Claisse 和 Lonvaud - Funel, 2000)。尽管细菌不能直接合成丙烯醛, 但是小部分的 3 - 羟基丙醛可经过化学脱水作用形成丙烯醛 (见图 11.7)。虽然丙烯醛本身对感官影响很小, 但是它与花色苷和酚类物质反应生成强烈的苦味物质 (Sponholz, 1993; Louw, 2001)。关于葡萄酒中的酚类物质参与的这类反应, 人们了解得不多。

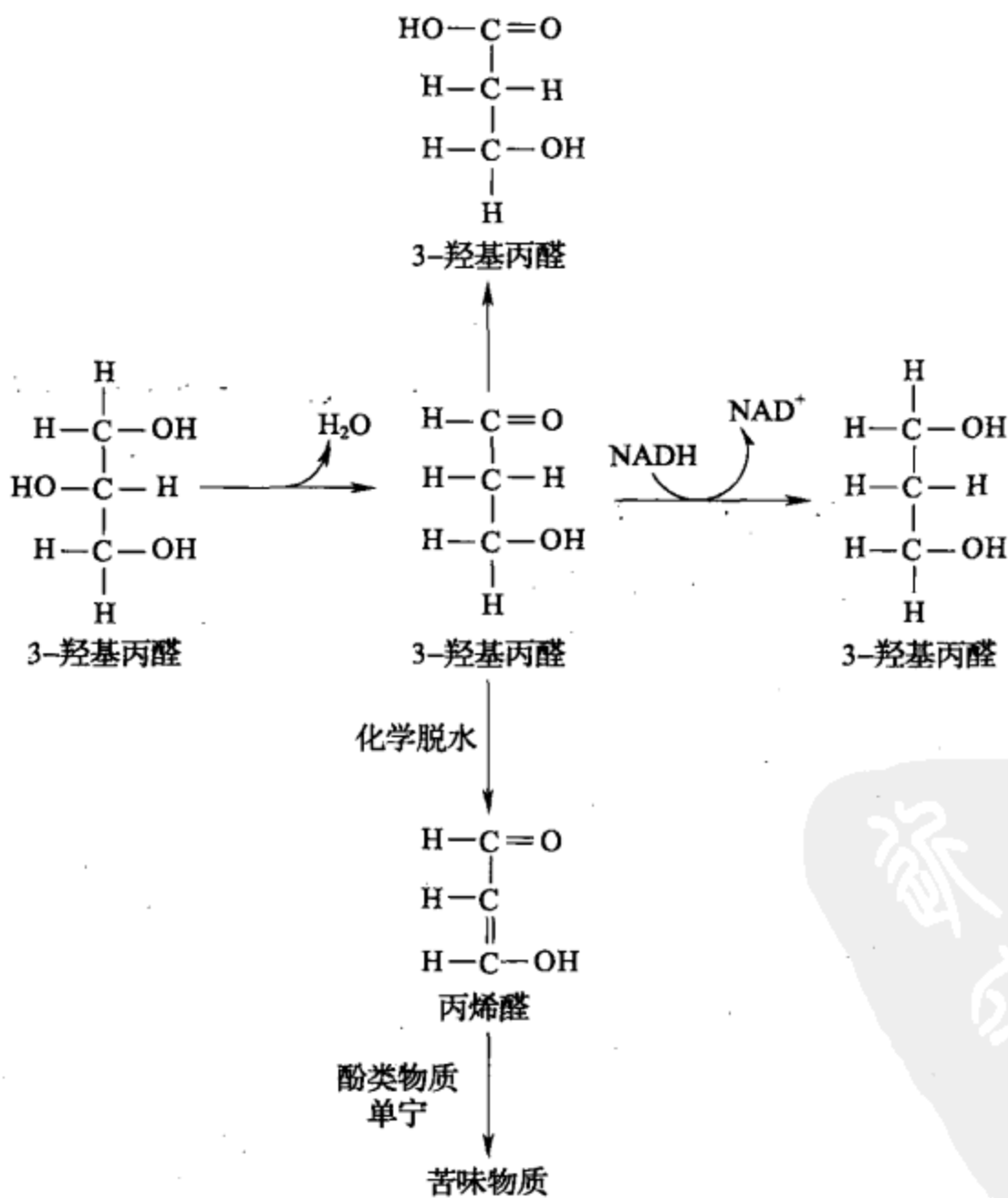


图 11.7 乳酸菌代谢甘油通过中间途径 3 - 羟基丙醛 (3 - HPA) 形成 1, 3 - 丙二醇和 3 - 羟基丙酸, 3 - HPA 脱水形成丙烯醛 [摘自 Scobolov 和 Smiley (1960), Slininger 等 (1983) 和 Schütz 和 Radler (1984)]

一般而言,只有少数的微生物能够代谢甘油。经过对大量乳酸菌的研究,Davis等(1988)报道一株酒酒球菌(研究的71株)、两株小片球菌(17株)、四种未命名的乳杆菌(13株)能够代谢甘油。在一些澳大利亚葡萄酒酿造工艺中小片球菌可利用甘油(Davis等,1986a)。其他相关的微生物包括短乳杆菌、布氏乳杆菌和立形乳杆菌,这些菌能够将甘油转化成1,3-丙二醇(Schütz和Radler,1984;Claisse和Lonvaud-Funel,2000;Sauvageot等,2000)。

许多分析特定碳水化合物代谢模式的研究主要集中于单一碳水化合物的利用(Davis等,1988;Edwards和Jensen,1992;Edwards等,1993;1998a;2000)。因此如果存在其他糖类或乳酸,一些细菌就能够利用甘油生产丙烯醛。一般认为,利用碳水化合物(或乳酸)所产生的副产物NADH在还原3-HPA为1,3-丙二醇时,被再次氧化成 NAD^+ (Schütz和Radler,1984;Claisse和Lonvaud-Funel,2000)。由于NADH不足,过量的3-HPA被化学脱水生成丙烯醛。因此,在苹果酸-乳酸发酵后生长的其他一些细菌如片球菌或乳酸菌可能产生足够的丙烯醛而赋予葡萄酒苦味,尽管这些菌种并不把甘油作为唯一的碳源。除了菌种的差异,较高的发酵温度以及葡萄醪糖度也有利于丙烯醛的产生(Louw,2001)。

11.3.8 甘露醇

如2.4.4所述,一些异型发酵细菌能够还原果糖形成甘露醇。从酿酒师的角度看,甘露醇形成的意义是不确定的。甘露醇和海藻糖醇的甜度分别是蔗糖的40%和75%(Godshall,1997),因此如果它们的浓度够高,就可能会影响到葡萄酒的甜度。Sponholz(1993)指出甘露醇对葡萄酒的影响非常复杂,因为甘露醇伴随着乙酸、D-乳酸、*n*-丙醇、2-丁醇和过量双乙酰的形成。该作者进一步指出,这种葡萄酒有一种“酸味酯”的味道,最好的防治办法就是抑制乳酸菌的不利生长(如灭菌过滤,增酸,添加 SO_2 和足够的清洗/消毒)。

11.3.9 黏性丝状物

在低酸干型葡萄酒中,片球菌和乳杆菌的生长会导致胞外多糖的产生,其中许多是 β -D-葡聚糖(Llaubères等,1990),也存在少量其他的单糖(Manca de Nadra和Strasser de Saad,1995)。酿酒师描述这种现象为“黏性”或“油腻”,这种问题一般可由于黏度的增加而被察觉。

有害片球菌和戊糖片球菌与葡萄酒中的这种现象有关(Manca de Nadra和Strasser de Saad,1995;Lonvaud-Funel,1999;Walling等,2005),也有报道乳杆菌能引起苹果酒出现黏性丝状物(Duenas等,1995)。影响细菌生长的因素也能影响到这种现象的出现。例如,在pH高于3.5时,由有害片球菌产生的胞外多糖明显提高(Walling等,2005)。尽管丝状片球菌比其他片球菌更能够耐受

乙醇、酸和 SO_2 (Lonvaud - Funel 和 Joyeux, 1988; Walling 等, 2005), 这些多糖的合成并不受乙醇的影响 (Walling 等, 2005)。

葡萄酒中的这种问题发生在乙醇发酵或是装瓶后 (Du Toit 和 Pretorius, 2000)。黏性丝状物一开始形成于桶的底部, 最终扩散到整个桶中。令人惊奇的是, 低水平的葡萄糖 ($50 \sim 100\text{mg/L}$) 可能已足以促使多糖的产生。这或许能部分解释为什么在装瓶几个月之后发现黏性丝状物的存在。Walling 等 (2005) 总结认为, 在非搅拌的葡萄酒中, 当高 pH 以及在葡萄糖和氮源存在时, 最易出现这种问题, 如果该问题及早发现, 可通过添加 SO_2 和降低 pH 来抑制细菌的生长 (Du Toit 和 Pretorius, 2000)。

11.3.10 酒石酸的利用

酒石酸不仅能作为一种不溶性的酒石酸钾盐沉淀剂 (KHT), 而且酿酒师普遍认为它具有微生物稳定性。但是乳酸菌却能够降解酒石酸 (Wibowo 等, 1985)。事实上, 法语术语 *tourne* 就是被用来描述由于微生物感染而造成的酒石酸损失 (Ribéreau - Gayon 等, 2000)。Wibowo 等 (1985) 的综述中, 报道了在苹果酸 - 乳酸发酵时观察到酒石酸下降 3% 至 30%。在加利福尼亚州采收过程中也发现了微生物分解酒石酸盐的现象 (K. C. Fugelsang, 个人实验)。

Krumperman 和 Vaughn (1966) 早期研究报道 5 种乳酸菌, 其中包括短乳杆菌和植物乳杆菌可以利用酒石酸。显然, 在同型发酵和异型发酵细菌之间代谢酒石酸的途径也不同。根据 Radler 和 Yannissis (1972) 的报道, 短乳杆菌 (异型发酵菌) 通过一系列中间产物, 琥珀酸、乙酸和 CO_2 能够转化酒石酸为草酰乙酸。通过比较, 植物乳杆菌 (同型发酵菌) 能够使草酰乙酸脱羧产生丙酮酸, 丙酮酸可被还原为乳酸或脱羧产生乙酸和 CO_2 。最近, 从葡萄酒酒脚中分离得到一种新的假丝酵母菌种能够降解酒石酸 (Fonseca 等, 2000), 但是这种酵母是否能引起葡萄酒腐败还不得而知。



第三篇

实验室操作规范与流程



第 12 章 显微观察基本方法

12.1 引言

如果酿酒厂要建立一个实验室，首先要考虑购买一台复式显微镜。显微镜可以使酿酒师快速监控酒精发酵和苹果酸-乳酸发酵，以此来判断微生物造成的问题。本章主要讲述葡萄酒微生物学的基本显微观察方法。

12.2 显微镜

一台配有 $10\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ 物镜的高质量明视野双目显微镜的价格为 \$1000 ~ \$3000；具有明视野和相差双重功能的显微镜价格大约在 \$3000 或更高；若带有成像系统等附件，则费用还会更高。一些明视野显微镜可通过添加配件升级成相差显微镜，但成本上并不经济。购买某些特殊型号的显微镜，必须事前了解生产商能否会提供配件或者服务。明智的做法就是事先与厂家取得联系，确认相关事宜。

放大率、分辨率和对比度是决定显微镜质量的三个要素。此外，显微镜还包括其他特性，如荧光性能。

12.2.1 放大率

使用显微镜，可将微生物放大，便于肉眼观察，而放大倍数取决于物镜和目镜的放大倍数。例如，目镜是 $10\times$ ，物镜是 $100\times$ （油镜），则放大倍数为 1000（ 10×100 ）。在理论上放大率可以是无限的，但实际上是有限制的，这一点我们不做详细说明。

配有 $10\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$ （油镜）三个物镜的显微镜可以满足大多数酿酒厂的需要。市场上销售的显微镜中，许多配有消色差物镜，通过消除色差，形成清晰的图像。平场消色差物镜更加昂贵，因为它可以纠正色差，形成更为清晰的图像，推荐用于更高要求的显微照相中。有些酿酒师使用 $15\times$ 的目镜替代标准的 $10\times$ 目镜，提高放大倍数，便于观察（如葡萄酒中的细菌）。

12.2.2 分辨率

分辨率是指显微镜工作时能够分辨出物体两点间的最大距离，它同放大率一样重要，是显微镜性能好坏的重要指标之一。物镜和盖玻片之间介质的折射率是影响分辨率的一个因素。在一般情况下，介质是空气，当然也经常用到其他的介质。介质可以增加折射率，从而提高分辨率。一般将香柏油滴加在物镜和盖玻片之间，但不能用于 $10\times$ 和 $40\times$ 的物镜，只能用于 $100\times$ 物镜。建议酿酒厂家都配备一个有 $100\times$ 物镜的显微镜，利用复式显微镜的油镜，放大倍数可达 $1000\times$ ，能观察 $0.2\mu\text{m}$ 数量级的物体，足以观察葡萄酒中最小的微生物。

12.2.3 对比度

如果不能将微生物从悬浮的基质中分离出来，会降低显微镜的放大率和分辨率。利用染料或调节光学系统，可增强对比度，便于显微观察。

微生物被染料染色后，光线经过时被吸收的程度高于背景，从而产生色差，加深了对比度。观察细胞内部结构或者细胞壁时，染色是一个非常有效的手段，如革兰染色。然而，染色经常使细胞结构发生变化，这个问题值得注意。虽然亚甲基蓝类染色剂不改变细胞形态，但化学药品对微生物终究是有毒性的。还有一个选择就是负染色法，利用苯胺黑使背景颜色加深，突出微生物的浅色而增加对比度，而且不影响细胞活性。通过染色法，能够得到微生物的相关信息，如细胞的形状和荚膜的位置等。相差显微镜不能观察颜色，所以可以用明视野显微镜来观察染色后的样品。

另一个增加对比度的方法是利用相差技术，它把透过标本的可见光的光程差变成振幅差，从而提高了各种结构间的对比度，使各种结构变得清晰可见。光线衍射的程度是由介质的折射率决定的。相差显微镜就是来增强微生物和周围环境之间的折射率而提高它们的对比度，使微生物形态更易于观察。与明视野显微镜相比，相差显微镜的优势在于可不用染色而清楚地观察活细胞。因为相差显微镜观察的样品不用染色，所以不适用于染色的样品。

12.2.4 荧光显微镜

荧光显微镜可用来估算微生物群体密度和生存能力，其原理为：某些分子能吸收特定波长的光，并释放出不同波长的光（即荧光），能够在荧光显微镜下被观察到。自然界有些物质（如叶绿素）能够产生荧光，人工合成的某些物质（如荧光团）也能产生荧光。荧光基团吸收蓝色光形成激发态，激发态电子迅速释放出多余的能量而返回到基态（图 12.1）。当电子释放能量回到基态时，释放出的绿色光能量较低，且波长较蓝色光长。然而，有些荧光基团能吸收绿色光而激发出能量更低、波长更长的红色光。

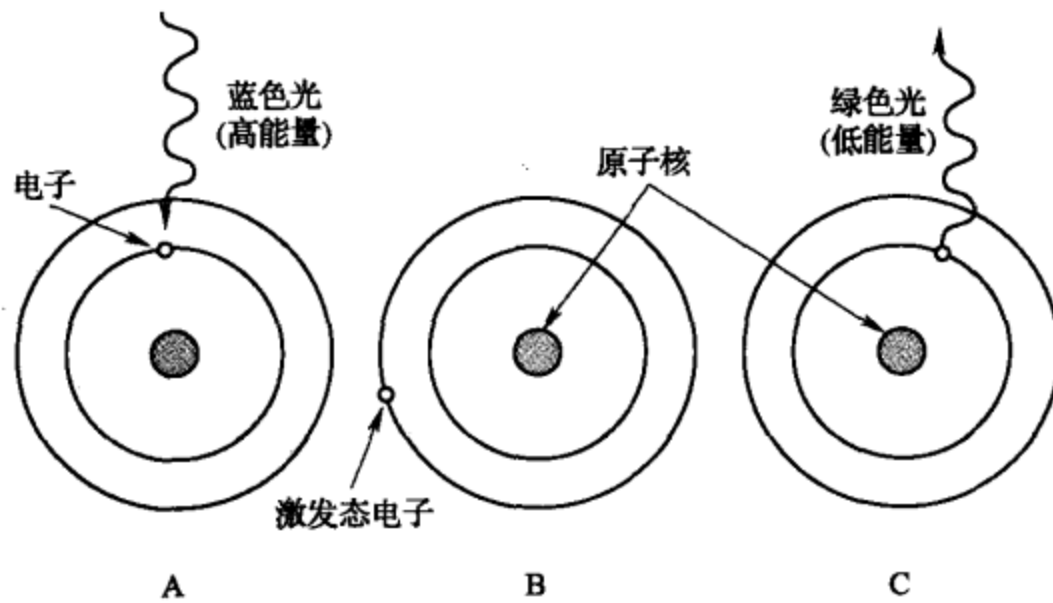


图 12.1 荧光形成示意图

- (A) 电子吸收蓝色光被激发；(B) 电子被激发到更高能级，形成不稳定态；
(C) 电子返回基态，激发绿光（荧光）

在荧光显微技术中，特定的染色剂被细胞直接吸收，或者与细胞中的有机物发生化学反应，或者被特定的亚细胞器富集。免疫化学技术也经常被应用于荧光显微技术（见 16.3.2），因为荧光染料可以与活细胞膜中某些部位发生特异反应，所以利用荧光显微技术可以区分活细胞与死细胞。“存活但无法培养（VBNC）”的细胞在标准微生物培养基上无法生长，可用荧光显微技术进行观察（见 6.1）。

Splittstoesser (1992) 介绍了一种直接落射荧光滤膜（DEFT）技术，染色剂为吖啶黄。Divol 和 Lonvaud - Funel (2005) 应用这种方法，以二乙酸荧光素（FDA）作为底物，活细胞分解二乙酸荧光素形成能产生荧光的产物。然而，Atlas 和 Bartha (1981) 发现，DEFT 和直接平板计数两种方法获得的结果存在差异（ 10^9 和 10^7 CFU），推测该差异是由于 VBNC 造成的。此外，Meidell (1987) 报道，防腐剂（如山梨酸）可以吸附在细胞上，从而遮挡部分荧光。

荧光显微镜与明视野显微镜、相差显微镜不同，它以高压汞灯作为光源，串联滤片仅允许荧光基团所激发的特定光线进入光路。为了观察荧光，用第二个滤片分离出更明亮的激发光。在暗背景下，对比度更好。

最新的技术是共聚焦激光扫描显微技术（LSCM），它以一个或多个激光发射器作为光源，缩短了激发光谱的带宽，传统荧光显微技术的带宽为 20 ~ 30 nm，而现在提高为 2 ~ 3 nm。激光扫描速度快，可以开发成检测系统。LSCM 的优点在于形成的图像清晰，便于观察内部精细结构，可形成三维立体图像。不过，这种系统十分昂贵。

12.3 显微镜使用方法

12.3.1 显微镜结构

显微镜的基本结构见图 12.2。

A 镜臂：显微镜的机械支撑。

B 镜筒：安装目镜和转换器。

C 聚光器：把光线聚集成“铅笔头状”的圆锥形，使更多的光线进入显微镜中。通过升高或降低聚光器的位置来调整进入显微镜的光线。

D 粗调节器：快速上下调节载物台对准样品。

E 光阑：增加或降低通过载玻片的光强度。

F 目镜：用于观察样品，放大倍数一般为 $10\times$ 。

G 细调节器：缓慢移动载物台，精确聚集。

H 反光镜：反射光线进入镜筒，高级的显微镜自带光源代替反光镜。

I 转换器：固定物镜，可旋转，转换不同放大倍数的物镜。

J 物镜：一般有三个不同倍数的物镜，低倍镜（ $10\times$ ）、高倍镜（ $40\times$ ）、油镜（ $100\times$ ），物镜固定在转换器上，通过旋转选用不同的物镜。使用油镜时，必须在物镜和样品之间加入香柏油，减少折射，有利于形成清晰影像。

K 载物台：放置样品，一般带有标本夹，防止标本移动。

L 载物台斜度调节器：调节显微镜的倾斜度，便于观察。注意不要倾斜过多，小心液体样品溢出载物台。

等焦点（面）：在低倍镜（ $10\times$ ）聚焦后，转换其他物镜，小幅微调即可观察。

放大倍数：眼睛看到像的大小与对应标本大小的比值。它指的是长度的比值而不是面积的比值。显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。

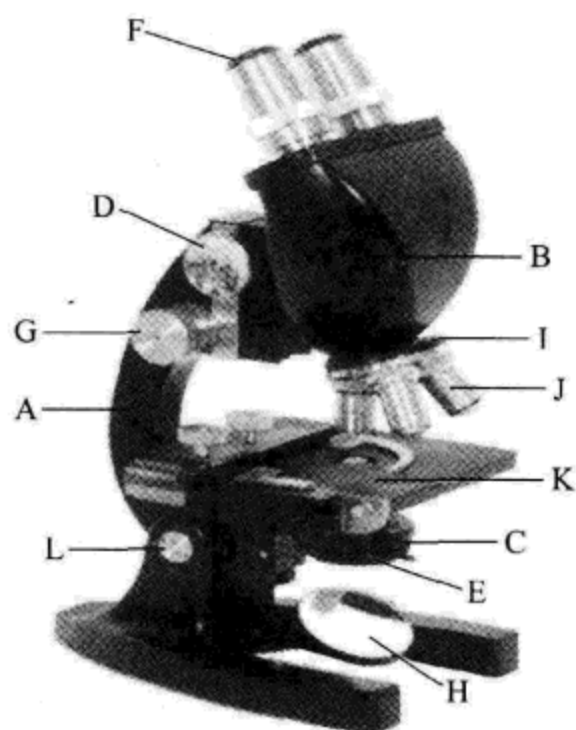


图 12.2 显微镜结构

12.3.2 使用方法

1. 先将制备好的载玻片放在载物台上，打开光源，调整反光镜，使光线直接照在反光镜上。

2. 把聚光器旋到最大，打开光阑。新购制的显微镜还要对光阑进行调试。

3. 将物镜转到低倍镜（ $10\times$ ），调节粗调器，聚焦。为了帮助调节，可以在洁净载玻片的一边用钢笔画一个“×”，然后将载玻片放置在载物台上，观察图像。在看清图像后，再调节聚光器和光阑，使光线和图像处于最佳状态。

4. 当物体聚焦好后，可以换高倍镜。使用油镜时，必须在物镜和样品之间加入一滴香柏油，高倍镜要求穿过聚光器的光线更强。

5. 为了确保镜头清洁, 必须使用专用的清洁液和擦镜纸, 禁止使用其他纸擦拭镜头, 防止擦伤镜头。

6. 对于相差显微镜, 维护好相板和环状光栅调节器至关重要。由于每个产品调节程序不同, 使用前最好咨询生产商, 以免发生差错。

12.3.3 目镜测微尺校准

有时, 酿酒师需要测定微生物菌体的大小, 以鉴定微生物。此时, 将目镜测微尺放入目镜中, 需对每个物镜进行校准, 同时再准备一个镜台测微尺。

1. 将目镜测微尺刻度朝下放入目镜中, 镜台测微尺放置在载物台中央, 透过目镜观察, 图像如图 12.3 所示。

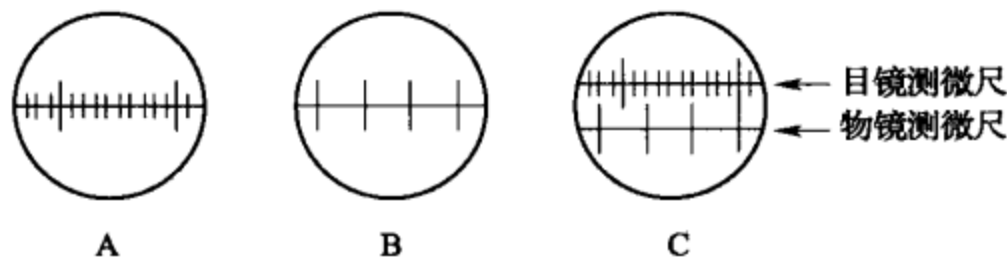


图 12.3 显微镜校准

(A) 目镜测微尺; (B) 镜台测微尺; (C) 显微镜中看到的图像, 镜台测微尺每格大小为 $10\mu\text{m}$

2. 用低倍镜观察 ($10\times$), 调节至清晰看到镜台测微尺刻度为止。

3. 聚焦后, 旋转物体到校准位置。用油镜时, 不要忘记加香柏油。

4. 移动镜台测微尺和旋转目镜测微尺, 使两者刻度尺保持平行, 并使其中垂直刻度线重合 (图 12.3C)。

5. 数两条重合线之间目镜测微尺和镜台测微尺的格数, 由于镜台测微尺刻度已知, 从镜台测微尺的长度可以推算出目镜测微尺每小格的长度。

如图所示, 目镜测微尺每小格长度 $= 10\mu\text{m} \div 4 = 2.5\mu\text{m}$ 。

6. 在该物镜下, 目镜测微尺两条刻度线之间的距离为 $2.5\mu\text{m}$, 假定测定某杆菌的大小为 3 格, 则它的大小为 $2.5\mu\text{m} \times 3 = 7.5\mu\text{m}$ 。

12.4 制备涂片

为了观察酵母菌或细菌的大小, 有时需要染色, 酵母菌经常用亚甲基蓝染料, 细菌常用革兰染料。染色前, 采用湿片法涂片, 然后加入染液并干燥 (见 12.5)。

12.4.1 液体培养物

1. 用接种环取一环或两环培养液于载玻片上;
2. 将液体均匀涂布在载玻片上;

3. 将涂片在室温下干燥，不能直接在酒精灯的火焰上加热；
4. 涂片干燥后，在酒精灯上方缓慢加温，固定菌体；
5. 染色、镜检。

12.4.2 固体培养物

1. 在载玻片上滴一至两滴无菌水；
2. 用接种针取少量菌体，在载玻片上涂匀；
3. 将涂片在室温下干燥，不能直接在酒精灯的火焰上加热；
4. 涂片干燥后，在酒精灯上方缓慢加温，固定菌体；
5. 染色、镜检。

12.5 制备湿片

实际上，酿酒师没有时间从样品中分离微生物后再进行观察，如果配备一台相差显微镜，样品制成湿片后很容易观察。一般来说，显微镜能看清微生物的最低数量要求为 10^4 个/mL，因此，应该调整显微镜的视野和/或浓缩样品，使微生物数量达到要求。

1. 用接种环或者滴管，取一滴葡萄汁或葡萄酒于洁净的载玻片上。如果果汁或酒中的微生物数量比较低，可以采用不断离心的方法进行浓缩。离心时，用锥形离心管取 10mL 样品， $3000 \times g$ 离心 15min，离心后倾去上清液，玻棒搅匀沉淀物，然后用巴斯德滴管吸取一滴沉淀物放置在玻片上。

2. 放一个盖玻片在吸取的液体上，做成湿片，然后分别用低倍镜和高倍镜观察。短期内保存，可以用凡士林封住盖玻片四周，防止湿片干燥。

12.6 制备霉菌的玻片培养物

霉菌的鉴定主要依赖于形态学特征，霉菌的生长培养基对其形态具有非常大的影响。如果霉菌生长杂乱无章，显微镜观察起来也很困难。制备湿片，对细菌和酵母菌来说意义不大，但对于霉菌，它则是一个典型的培养方法，制作过程如下。湿片的优点在于染色后对微生物的机械损伤最小。Harrigan (1998) 描述过类似的方法 (Johnson's 玻片培养法)。

1. 将 A、B 液等体积混合，配制乳酚-苯胺蓝染料：

a. A 液：将 10g 苯酚与 10mL 蒸馏水缓慢混合，完全溶解后，加入 10mL 乳酸和 10mL 甘油；

b. B 液：配制苯胺蓝饱和溶液，取 10mL 染料，加入 10mL 甘油和 80mL 蒸馏水。

2. 在灭菌后的平板中倒入无菌的 PDA 培养基，冷却，凝固。
3. 准备一个无菌的培养环境（灭菌的培养皿、U 形玻璃棒、载玻片、盖玻片），如图 12.4 所示。

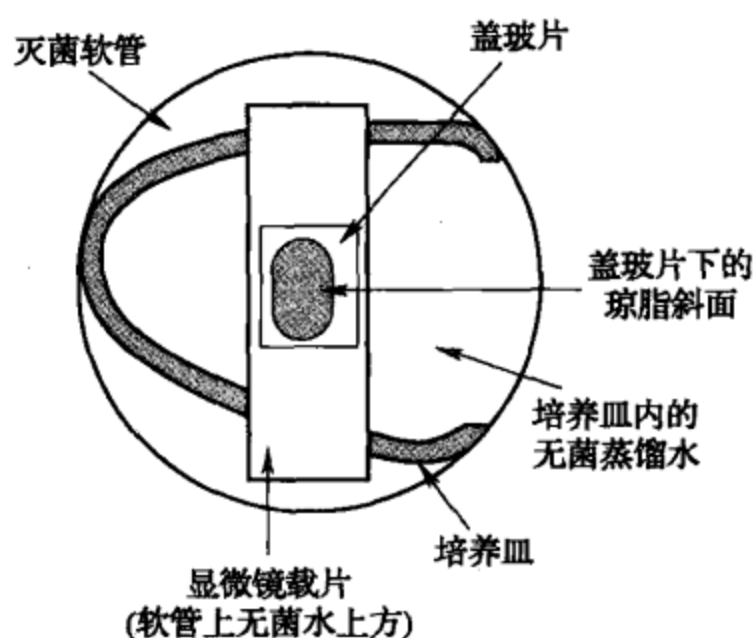


图 12.4 霉菌观察培养装置

4. 用无菌小刀切取盖玻片大小的正方形琼脂块（约 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ ），放在载玻片上。
5. 用无菌接种针在琼脂块四周接种霉菌孢子。
6. 用无菌镊子在接种的霉菌琼脂块上盖上盖玻片。
7. 将载玻片转移到无菌平板中，室温培养（12 ~ 36h）。培养过程中可以在干燥环境下，低倍镜观察。为了减少污染的几率，显微观察不能过于频繁。
8. 当菌丝体培养好后，制作湿片。取洁净的载玻片，加一两滴乳酚 - 苯胺蓝染料，从培养皿中小心取下盖玻片，放在载玻片上染色，观察。湿片可以用指甲油在盖玻片四周密封，保存。

第 13 章 培养基配制和培养技术

13.1 引言

微生物生长与鉴定用的培养基种类繁多，既有液体的（如肉汤培养基），也有含琼脂的固体培养基。对酿酒师而言，所使用的培养基可以像酵母种子活化与扩培用的稀释无菌葡萄汁一样简单，也可以像培养乳酸菌一样复杂，必须满足许多条件。

过去，微生物学家将许多不确定成分混合煮沸并加入固化用的凝胶来制作培养基。凝胶比例为 150g/L 的培养基，在 26℃ 时就会液化，并不适合在较高温度下接种。现在常用琼脂来解决这个问题。琼脂是一种从海藻中提取的多糖，添加浓度大致在 1% ~ 2%。琼脂不能被酵母和细菌利用，并且不会出现凝胶高温液化的问题。

各种各样脱水培养基的问世，极大地缩短了制备培养基的时间。使用时，只需要加入蒸馏水并进行高压灭菌即可。生产商可根据需要，提供各种特定的培养基。即使不能购得特殊的培养基，也能获得所需的培养基成分。微生物培养基的主要生产商有 Difco、BBL 和 Oxoid。为了降低成本，可从生产商处获得常规培养基配方，以自制培养基。

干燥的培养基易吸湿，所以开封后有一定的保质期（Flowers 等，1992）。通常未开封的培养基可保存一年，但使用后剩余的培养基必须在 6 个月内使用完毕。一般在低温、干燥、避光的条件下保存培养基。如果培养基凝结成块或出现不良气味、颜色，该培养基不能继续使用。由于开封后的培养基容易变质，所以应根据实验进度购买合适规格的安装。

13.2 培养的理化需求

较好地培养微生物，必须满足一些条件。例如，培养基要含有可利用的有机碳源（通常是糖类）和氮源，碳源提供能量，氮源被用于合成氨基酸、蛋白质、酶、核酸。此外，培养基还应包括其他多种成分如维生素和矿物质。培养基的 pH、培养温度和通气条件（好氧或厌氧）都必须进行优化。从葡萄汁或葡

萄酒中分离的微生物，具有丰富多样的营养需求（见第1~4章）。

13.2.1 碳源和氮源

微生物的生长和代谢需要可利用的碳源和氮源。通过添加或去除某种或某些成分来改变培养基的组成，能够从复杂的微生物体系中分离到一种或一类特殊的微生物，即使这些微生物的浓度非常低。以赖氨酸为唯一氮源的赖氨酸琼脂培养基就是一个很好的例证。由于酿酒酵母生成了一种中间抑制物而不能在这种培养基中生长，但能以这种氨基酸为唯一氮源的非酿酒酵母却可以在这种培养基中生长。

13.2.2 氧

氧的需求和耐受取决于微生物的特性。一些微生物是完全好氧（绝对好氧菌），一些微生物却能被极少量的氧迅速杀死（绝对厌氧菌）。尽管酿酒师通常不用考虑那些绝对厌氧的微生物，但好氧微生物（如霉菌）在葡萄的生长与酿酒过程中起着重要作用。对于酿酒师而言，尤其值得注意的是那些在有氧或无氧条件下均能生长的兼性好氧微生物。

在葡萄酒的酿制过程中，有两类兼性好氧微生物。有发酵能力的酵母，如酿酒酵母，既能在氧含量比较低的汁中发酵，也可以在暴露于空气的葡萄酒表面生长。然而酿酒酵母不能长时间在厌氧条件下生长，因为细胞某些缺少的成分只能在有氧的条件下才能合成（见1.4.2）。除了具有发酵能力的酵母，乳酸菌具有发酵代谢途径，生长时不需要氧。这些细菌能在有氧条件下生长，但在含氧量较少时生长更好（微需氧）。葡萄酒中可发酵的菌种通常可以在低氧环境中进行培养。可以用穿刺培养、上层琼脂技术（在已接种微生物的固体琼脂表面再倾倒一层无菌琼脂）、蜡烛罐、GasPak® 体系来实现所需的低氧环境。

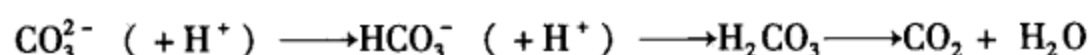
13.2.3 氢离子浓度（pH）

在微生物的培养鉴定中氢离子浓度起着非常重要的作用，也可以用于选择性富集培养。依据培养基的组成和微生物的特性，酵母或细菌生长过程中会导致pH的剧烈变化。如在富含氨基酸和多肽的培养基中生长会生成氨（提高pH），而在富含糖的培养基中生长会产酸（降低pH），pH是否升高或降低取决于培养基的缓冲能力。最终两种情况都会对微生物的生长产生抑制和潜在的毒害作用。

减少生长过程中生成的酸或碱产生的不良影响，常用的措施是在培养基中加入缓冲液。通常是在配制微生物培养基时加入磷酸盐缓冲液，磷酸盐能使pH维持在7左右。更重要的是，低浓度的磷酸盐（ $<5\text{g/L}$ 磷酸钾）对微生物是相

对无毒的。虽然所需的培养基最终 pH 决定了缓冲液的种类和浓度,但典型的缓冲剂是弱碱盐(如 K_2HPO_4)与弱酸盐(如 KH_2PO_4)的混合物。在等摩尔浓度混合时,最终的缓冲液大约是 pH6.8。

在有些情况下,微生物可以利用糖或乙醇生成大量的乙酸,生成的量远远超出了培养基的缓冲能力。酒香酵母/德克酵母或醋酸菌的培养就是这种情况,因为酸度的改变,微生物会提前死亡。可以向培养基中添加碳酸钙(CaCO_3)来解决这个问题。因为这种盐是不溶于水的,所以它不会立即对培养基的 pH 产生影响,而微生物生成的酸会与它发生反应生成 CO_2 。



微生物学家也利用这些化学反应来迅速筛选产酸微生物。在含有 CaCO_3 的培养平板上,产生有机酸的微生物菌落周围会出现清晰可见的透明菌圈,这与浑浊昏暗的背景对比鲜明、易于鉴别。

13.2.4 水分和水活度

酵母、细菌和霉菌的生长都需要一定量的水分,一般来说,葡萄酒中生长的酵母和细菌比霉菌需要更多的水分。在培养基凝固时,琼脂会结合部分水,并且降低了游离态水或水活度(A_w)。因此,在使用琼脂时,应该遵守生产商建议使用的比例。如果水活度太低,微生物将无法生长。

在倒平板的过程中可能失去更多的水分,例如,使用刚灭过菌的培养基倒平板,培养基中的水分会加速蒸发,在培养皿的盖上凝结,降低水活度,而使平板中的培养基变硬,影响微生物的生长。为了避免这个问题,建议倒平板前,将融化的培养基转移到 $45 \sim 50^\circ\text{C}$ 的水浴锅中保温,减少水分的损失。如果一次要倒很多平板,在倒平板的同时,对三角瓶中的培养基进行保温,防止琼脂凝固。

水分随培养基保存时间的延长而损失增加。一般培养基保存在冰箱中,这也增加了培养基的脱水。因此,培养基灭菌后应尽快使用。如果倒好的平板要保存,应该保存在原来的塑料套筒内,以减少水分的损失。如果接种后的培养皿培养时间超过一周,要在培养箱中放一杯水增加培养箱中的相对湿度,而减少培养皿中水分的损失。其次,用密封胶带(如石蜡膜)密封培养皿,也可以减少脱水现象。

13.2.5 培养温度和条件

大多数微生物的适宜生长温度为 $15 \sim 40^\circ\text{C}$,实验室一般用生化培养箱来控制温度,多数葡萄酒微生物在室温条件下($20 \sim 25^\circ\text{C}$)生长良好。有些乳酸菌的最适生长温度要高一些(30°C),在室温下也可以生长,但生长速度稍慢。一般培养皿采用倒置培养,以减少空气中微生物的污染。

13.2.6 选择性抑制剂

为了促进或抑制某一种或某一类微生物的生长，时常在培养基中加入抑制剂。例如，放线菌酮经常用来抑制酵母的生长，使用浓度为 10 ~ 20mg/L，而酒香酵母/德克酵母可以耐受 50mg/L 的浓度，克勒克酵母的耐受浓度甚至更高，达到了 100mg/mL（Pfaff 等，1978）。表 13.1 列举了分离葡萄汁和葡萄酒中微生物的抑制剂。

表 13.1 从葡萄汁或葡萄酒中分离微生物选择性抑制剂浓度

试剂	使用浓度	抑制的微生物种类	未抑制的微生物种类
放线菌酮	20 ~ 100mg/L	酿酒酵母	非酿酒酵母、乳酸菌、醋酸菌
匹马菌素	50mg/L	酿酒酵母	非酿酒酵母、乳酸菌、醋酸菌
土霉素	100mg/L	乳酸菌、醋酸菌	酿酒酵母、非酿酒酵母
丙酸盐	1 ~ 2g/L	霉菌	酿酒酵母、非酿酒酵母、乳酸菌、醋酸菌
链霉素	25mg/L	乳酸菌	醋酸菌

在灭菌前后都可以加入放线菌酮，但高温蒸汽灭菌会使它的活性降低大约 50%，因此要计算好用量。放线菌酮对酿酒酵母的抑制浓度 < 20mg/L，所以灭菌前要向培养基中添加足量的放线菌酮。在液体培养基中，也可以用无菌滤膜（0.45μm）来过滤放线菌酮溶液，然后加入灭菌后的培养基中。

放线菌酮是有毒危险品，使用时要注意安全，避免皮肤接触和吸入口中。使用方法及废液处理请参照物质安全数据表（见 19.2.2）。

13.3 培养基和实验用品的灭菌

灭菌的目的是为了杀死或除去所有活的微生物及具有繁殖能力的孢子（霉菌的分生孢子、酵母的子囊孢子、细菌的内生孢子）。常用的灭菌方法有沸水灭菌、高压蒸汽灭菌、干热灭菌、物理除菌、化学杀菌等。

13.3.1 沸水灭菌

沸水中煮 5 ~ 10min，可以杀死活细胞，但不能杀死细菌的孢子（Harrigan, 1998）。在没有高压蒸汽灭菌锅的情况下，可以将金属器具、膜滤器等在蒸馏水中煮沸大约 20min（100℃）。它的缺点是不能用于对湿器具的灭菌。

13.3.2 高压蒸汽灭菌

多数培养基可用高压灭菌锅进行蒸汽灭菌，但高温会造成维生素和一些糖的降解。高压灭菌锅的操作与家庭烹饪使用的高压锅相似，虽然高压锅也能用

于灭菌，但不推荐该用途。在高压灭菌锅灭菌时，环境中充满高温、高压的饱和蒸汽（121℃，103.4kPa）。当培养基内部温度超过沸点时，饱和蒸汽可以防止其中的水沸腾。对≤1L的培养基，一般灭菌时间为121℃/15min。如果体积增加，灭菌时间相对延长。

综上所述，容器中培养基不能装满，装量按照表13.2的说明进行。对于带螺旋盖的玻璃容器和塑料容器，建议灭菌前螺旋盖拧半紧，灭菌后立即拧紧。如果受力不均匀，灭菌时容器会变形。最后，许多实验室用棉塞代替价格昂贵的金属帽或螺旋盖。灭菌时为了减少冷凝水浸湿棉塞，要用大小适宜的铝箔纸包住容器的颈部。

表 13.2 灭菌前容器装量推荐表

容器类型	体积	最大装量
烧瓶	250mL	100mL
	500mL	200mL
	1000mL	400mL
三角瓶	100mL	40mL
试管	18mm × 150mm	15mL

注：根据 Pawsey (1974) 推荐建议。

完成灭菌后，排出蒸汽，压力下降到正常水平。高压灭菌锅有两种排气装置：快放和慢放，快放功能适用于玻璃器皿、试管等未装培养基的器具，慢放适用于装有液体培养基、固体培养基的器具。因为对热敏感的物质随受热时间的延长会加剧分解，所以灭菌后应尽快从灭菌锅中取出培养基。

谨记在高压灭菌锅的蒸汽排尽前，严禁打开灭菌锅的锅盖，否则会引起严重的烫伤。如果压力下降过快，会导致容器内培养基暴沸而冲出容器，污染灭菌锅而且难以清洗。从灭菌锅中取出培养基时，尽量不要摇动培养基，以防过热的培养基暴沸，冲出容器造成烫伤，并推荐戴上隔热手套。

经验证明，高压灭菌锅在使用过程中需要检修。培养基的灭菌主要依赖于高压灭菌锅，故灭菌锅必须每年进行基本的检修，以确保安全运行。各种热敏、压敏测试条可以确保正常灭菌。灭菌前，测试条可以直接附着在装有培养基的容器上，或者放置在包裹好的实验用品里，在达到所需的灭菌条件时，测试条会变色。

13.3.3 干热灭菌

与高压蒸汽灭菌相比，干热灭菌效率较低，主要用于未装液体的器具，如空的玻璃仪器等。一般玻璃吸管放置在金属容器中，于170℃灭菌2h，其他的玻璃仪器（如三角瓶等）灭菌1h。灭菌前要将橡胶垫圈等热敏部件去掉。

绝对不能用烘箱来融化含有琼脂的固体培养基,因为这样操作会导致培养基中的水分蒸发过多。也不能用高压灭菌锅融化培养基,否则培养基中不耐热的营养成分会被破坏。固体培养基的融化,可以使用沸水浴或微波炉,微波炉融化时间短,一般为几分钟,水分损失少。

13.3.4 过滤除菌

有些培养基含有一些热稳定性差的物质,这些培养基一般利用滤膜过滤除菌。与使用深度滤膜的过滤系统不同,过滤除菌所用的滤膜孔径非常小,微生物不能通过而被截留在膜表面。实际上,滤膜的标注孔径存在一定的误差。例如,规格为 $(0.45 \pm 0.02) \mu\text{m}$ 的滤膜,最大孔径直径不允许超过 $0.47 \mu\text{m}$ (见5.3.2)。

大多数滤膜是由多孔醋酸纤维制成的,其孔径具有一定的范围,一般从 $0.22 \mu\text{m}$ 到几毫米。要完全除去最小的微生物(如细菌),滤膜的孔径必须小于 $0.45 \mu\text{m}$ 。先用铝箔包裹滤器,外侧用牛皮纸包裹,再进行高压蒸汽灭菌,不能直接灭菌。另一方面,可以购买一些小型过滤系统,用于少量培养基的灭菌。

滤膜过滤器的缺点就是易堵塞,对于某些浑浊的悬浮液(如乳酸菌培养所用的培养基中含有肝浸膏), $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜很易被堵塞。在这种情况下,就要对培养基进行预过滤,除去培养基中的悬浮物。预过滤可以用Whatman 1号滤纸过滤,或者离心过滤,然后再用滤膜过滤。

13.3.5 化学灭菌

因为微生物可以通过空气传播,实验室充满了微生物,所以在工作之前应该对实验室进行消毒。多种气雾型消毒剂可以喷洒在物体的表面进行杀菌,也可以使用含氯的漂白剂对环境进行消毒,紫外光也常常用来对环境消毒,但大多数实验室都使用液态消毒剂(表13.3)。葡萄酒厂也可以像实验室一样使用消毒剂(第9章),如碘液、QUATS等。也有的实验室使用含苯酚的合成剂,如 o -苯基苯酚(Lysol[®])、六氯酚(PhisoHex[®])等。

70%酒精也是葡萄酒厂常用的一种消毒剂,用于器具表面的消毒,如镊子、解剖刀、接种环等。把镊子等器具浸入70%酒精中,然后在酒精灯上点燃消毒,火灭后,等器具冷却后才能使用。由于酒精易燃,不能靠近明火。此外,在消毒时,器具正在消毒的一端应该向下,防止多余的酒精流向末端,烧伤手,或者烧着衣服,引起火灾。应该说明的是,高浓度酒精(如95%)没有杀菌作用。

塑料等不能干热灭菌的器具,可以用环氧乙烷或臭氧来灭菌。但由于环氧乙烷具有毒性,易爆性,不能广泛使用。

表 13.3 实验室常用消毒剂的比较

特性	漂白粉 (Chlorox®)	碘液 (Wescodyne®)	乙醇	QUATS (Roccal® -D)	苯酚 (Lysol®)	氧化剂 (Virkon -S®)	洗必太双氯 苯双胍己烷 (Nolvasan®)
浓度/% (体积分 数)	0.01 ~5	0.5 ~5	70	0.1 ~2	0.2 ~3	0.2 ~3	0.2 ~3
硬水敏感性	+	-	+	-	+	+	+
有机物敏感性	+	+	+	+	-	+	+
洗涤剂敏感性	-	+	-	+	-	-	-
残留	-	-	±	±	-	-	+
对细菌的灭菌能力	+	+	+	+	+	+	+
对酵母/霉菌的灭 菌能力	+	±	+	±	±	±	±
对病毒的灭菌能力	+	+	±	-	-	+	-

注：“+”表示有作用，“-”表示无作用，“±”表示有些有作用，有些没有作用。

在葡萄酒厂的实验室中，对用于培养酵母或细菌种子液的葡萄汁进行灭菌，存在困难。加热葡萄汁，会形成一种“煮味 (cooked)”，并转移到葡萄酒中，影响酒的品质。虽然葡萄汁可以采用过滤除菌，但滤膜堵塞严重。另一个方法就是使用焦碳酸二甲酯 (DMDC，商品名为 Velcorin) (见 5.2.2)，浓度为250 ~400mg/L，可以在几小时内抑制葡萄汁中微生物群落的生长，残留的 DMDC 迅速分解为甲醇和 CO₂ (Porter 和 Ough, 1982)。但是，DMDC 作用时间短，具有毒性，防止吸入。

13.4 培养基的贮存

不论是固体培养基或液体培养基，配制好后最好在一周之内使用。为了提高效率，有些实验室一次性准备大量的培养基供长期使用。因此，在培养基贮存期内，最好使用有螺旋盖的容器，并且贮存在冰箱中。肉汤培养基贮存时，取一支带体积刻度的培养基试管作参照，同时标注体积刻度。贮存期间，如果体积损失超过 10%，则不能使用，需丢弃。表 13.4 总结了肉汤培养基和固体培养基在不同容器、4℃下的最长贮存时间。

表 13.4 培养基的贮存时间

容器类型	培养基类型	贮存时间 (4℃)
塑料袋	预制好的培养皿	2 周 (如果直接从试剂公司购买， 贮存时间可长些)
带螺旋盖的三角瓶等	琼脂固体培养基	3 个月
无螺旋盖试管	肉汤或琼脂固体培养基	1 周
有螺旋盖试管	肉汤或琼脂固体培养基	3 个月

注：根据 Clesceri 等 (1989) 建议，数据获美国公共卫生协会许可使用。

13.5 酵母和霉菌培养基

有多种培养基可用于从葡萄汁和葡萄酒中分离、鉴定或/和计数微生物。麦芽汁培养基对酵母是一种非选择性培养基,通常用于酿酒酵母的计数(King和Beelman, 1986)。在22~25℃培养2~4d,在平板上就可以形成单菌落。类似地,葡萄汁中加入琼脂制成的固体培养基也是一种非选择性培养基,大多数酵母、细菌、霉菌都可以生长。

WL营养肉汤培养基和固体琼脂培养基(Anonymous, 1984)是非酿酒酵母、酿酒酵母、接合酵母、酒香酵母和霉菌的常用培养基。实际上,由于酵母形态的独特性,在发酵过程中,这些培养基被用来监测酵母的群落(Pallman等, 2001)。各种酵母形态的描述见15.2。

“WL”是Wallerstein Laboratories名称的缩写,最初的商品培养基是由他们实验室发明的。WL培养基有时被称为WL营养培养基(WLN),不含放线菌酮,可以测定酵母菌落。在WL培养基中,含有溴甲酚绿pH指示剂,可以快速地分离产酸酵母。此外,WL培养基中含有胰蛋白胨,它是用胰蛋白酶水解酪蛋白而获得的,生产商为Difco公司。

与此相关的培养基为WL分离培养基(WLD)或WL放线菌酮培养基(WLC),它们包含放线菌酮,是一种选择性培养基,可以从酵母属中分离出酒香酵母。值得注意的是,在商品WLD培养基配方中,放线菌酮的浓度为4mg/L,浓度低于10mg/L的放线菌酮可以抑制酿酒酵母(Vilas, 1993)。许多酿酒师将放线菌酮的浓度增加到50mg/L,用WL作为酒香酵母分离的选择性培养基。目前没有证据表明,某些对放线菌酮敏感的酒香酵母在含有放线菌酮的培养基中不能很好地生长。

除WLD培养基外,酒香酵母还可以在其他选择性培养基上生长。酒香酵母培养基A(Vilas, 1993)和培养基B含有放线菌酮作为选择剂,酒香酵母培养基C含有放线菌酮和氨苄青霉素(B. Watson, 私人交流, 1998)。Rodrigues等(2001)最近开发了酒香酵母培养基D(德克酵母/酒香酵母鉴别培养基, DB-DM),作为一种选择性培养基,用于从酵母属和其他酵母中分离酒香酵母,那些不能以乙醇作为唯一碳源的菌株也可以生长。由于生长缓慢,培养时间长,一般需要7~14d才能看见酒香酵母的菌落。有研究表明,使用酒香酵母培养基C 3d后即可看到菌落。如果酒香酵母产生大量的乙酸,在培养基中可以添加20g/L的碳酸钙,中和乙酸(见13.7)。

赖氨酸琼脂培养基被用来培养非酿酒酵母,赖氨酸作为唯一的氮源(Morris和Eddy, 1957)。由于这种培养基用量大,购买方便,不需配制。

如果推测某种酵母可能是接合酵母,分离时可以使用添加1% (体积分

数) 乙酸的接合酵母培养基, 在接合酵母培养基上, 酿酒酵母不能生长, 而大多数接合酵母 (*Z. bailii* 和 *Z. bisporus*) 可以生长, 少数接合酵母 (*Z. rouxii*) 则不能生长。另外一些接合酵母选择性培养基也是可以的 (Makdesi 和 Beuchat, 1996)。

有一些培养基可用于霉菌的培养, 氯硝胺孟加拉红氯霉素琼脂 (DRBC) 培养基中含有玫瑰红, 限制霉菌菌丝体在培养基表面扩散, 同时, 氯霉素可以抑制细菌的生长 (Mislivec 等, 1992)。一般建议 DRBC 培养基用于酵母菌和霉菌的计数, 可以从 Oxoid 公司购买到。霉菌计数一般使用平板涂布, 而不是倾注培养, 涂布法可以使琼脂表面充分接触氧气, 同时可以避免热效应引起的琼脂融化 (Mislivec 等, 1992)。

13.5.1 麦芽汁培养基

- 1. 称取 150g 糖化麦芽汁浸液, 加入 850mL 蒸馏水中混匀;
- 2. 在 100℃ 沸水煮 10min, 纱布过滤, 加入 20g 琼脂, 溶解;
- 3. 121℃ 高压蒸汽灭菌 15min。

13.5.2 葡萄汁培养基

- 1. 取 250mL 新鲜葡萄汁到 1L 容量瓶中, 补充蒸馏水到 1L。葡萄汁中不能含有 SO₂ 和山梨酸等防腐剂;
- 2. 121℃ 高压蒸汽灭菌 15min;
- 3. 如果要制备固体培养基, 在 800mL 液体培养基中加入 20g 琼脂, 融化后补充水分到 1L, 高压蒸汽灭菌。

13.5.3 WL 培养基

- 1. 混合并溶解下列成分:

酵母抽提物	4g
酪蛋白胨	5g
葡萄糖	50g
KH ₂ PO ₄	0.55g
KCl	0.425g
CaCl ₂	0.125g
MgSO ₄	0.125g
FeCl ₃	0.0025g
MnSO ₄	0.0025g
溴甲酚绿	0.022g
蒸馏水	800mL



琼脂（固体培养基需添加）15g
最终 pH 5.5。

2. 溶解各成分后补充水分到 1L，121℃灭菌 15min。

3. 根据需要，在 WLD/WLC 培养基冷却后未固化前添加除菌过滤后的放线菌酮。放线菌酮的终浓度应保持在 20 ~ 100mg/L，以抑制酿酒酵母。常用浓度为 50mg/L。

13.5.4 酒香酵母培养基 A

1. 混合并溶解下列成分：

蛋白胨	50g
酵母抽提物	30g
葡萄糖	100g
麦芽抽提物	30g
蒸馏水	800mL

2. 溶解各成分后补充水分到 1L，121℃灭菌 15min。

3. 根据需要，在 WLD/WLC 培养基冷却后未固化前添加除菌过滤后的放线菌酮。放线菌酮的终浓度应保持在 20 ~ 100mg/L，以抑制酿酒酵母。

13.5.5 酒香酵母培养基 B

1. 混合并溶解下列成分：

麦芽汁琼脂	48g
细菌甘油（Bactoglycerol）	2.4mL
放线菌酮	0.050g
蒸馏水	800mL
琼脂	20g

2. 溶解各成分后补充水分到 1L，121℃灭菌 15min。

3. 灭菌后取出培养基，放入 50℃水浴中保温，然后倾倒平板。

13.5.6 酒香酵母培养基 C

1. 混合并溶解下列成分：

蛋白胨	20g
酵母抽提物	10g
葡萄糖	20g
放线菌酮	0.003g
琼脂	17g
蒸馏水	800mL

2. 溶解各成分后补充水分到 1L, 121℃ 灭菌 15min。
3. 称取硫胺素 1mg, 氨苄青霉素 100mg, 溶解在 20mL 蒸馏水中。
 - a. 维生素配制成 1mg/mL 溶液, 过滤除菌, 4℃ 保存;
 - b. 氨苄青霉素配制成 1mg/mL 溶液, 过滤除菌, -20℃ 保存。
4. 将灭菌的硫胺素/氨苄青霉素溶液加入灭菌后冷却至 50℃ 培养基中。
5. 倒平板。

13.5.7 酒香酵母培养基 D

1. 混合并溶解下列成分:

YNB (Yeast nitrogen base)	6.7g
乙醇	60mL
放线菌酮	0.010g
p-香豆酸 (吡喃酮酸)	0.10g
溴甲酚绿	0.022g
蒸馏水	500mL

最终 pH5.4。

2. 0.45μm 滤膜过滤除菌。
3. 称取 20g 琼脂在 500mL 蒸馏水中溶解, 121℃ 灭菌 15min。
4. 混合各营养成分, 加入灭菌后的琼脂, 倒平板。

13.5.8 赖氨酸培养基

1. 微量金属元素溶液 A:

硼酸	0.1g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.04g
钼酸铵	0.02g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.04g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.25g
蒸馏水	800mL

溶解后, 补充水分到 1000mL。

2. 基础培养基 B:

葡萄糖	50g
KH ₂ PO ₄	2.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0g
CaCl ₂	0.2g
NaCl	0.1g
腺嘌呤	0.002g

DL - 甲硫氨酸	0.001g
L - 组氨酸	0.001g
DL - 色氨酸	0.001g
微量金属元素 A	1.0mL
乳酸钾 [50% (质量分数) 溶液]	12.0mL
蒸馏水	800mL

a. 溶解后加蒸馏水到 1000mL, 用乳酸调整 pH 到 5.0 ~ 5.2。

b. 加琼脂 20g。

3. 赖氨酸溶液 C:

赖氨酸	10g
蒸馏水	800mL

溶解后补充水分到 1000mL。

4. 溶液 D:

肌醇	2.0g
泛酸钙	0.2g
硫胺素	0.04g
吡哆醇	0.04g
<i>p</i> - 氨基苯甲酸	0.02g
烟酸	0.04g
核黄素	0.02g
生物素	0.0002g
叶酸	0.0001g
蒸馏水	800mL

溶解后补充水分到 1000mL。

5. 根据 Morris 和 Eddy (1957) 的建议, 基础培养基 B、赖氨酸溶液 C、溶液 D 分别单独蒸汽灭菌 30min。其中溶液 C 和 D 可以用 0.45 μ m 膜过滤除菌, 基础培养基 B 也可用过滤除菌, 但琼脂要蒸汽灭菌, 然后与其他成分一起混合。

6. 灭菌后, 将基础培养基 B、C、D 溶液在 45 ~ 50 $^{\circ}$ C 水浴保温, 防止凝固。无菌操作, 按比例混合 B (89%)、C (10%)、D (1%)。

13.5.9 接合酵母培养基

1. 称取下列物质:

葡萄糖	100g
酵母抽提物	10g
胰蛋白胨	10g
蒸馏水	800mL

- 琼脂（固体培养基）25g
2. 溶解各成分后补充水分到 1L，121℃ 灭菌 15min。
3. 灭菌后取出培养基，放入 45 ~ 50℃ 水浴中保温。
4. 加入冰醋酸 10mL，混匀，倒平板。

13.6 乳酸菌培养基

乳酸菌的营养条件要求更高，属微需氧菌，低氧条件下，在富含水果或蔬菜汁的培养基上生长良好。尽管特殊的培养箱可调控所需的气体环境，但成本高，而且在大多数情况下，被证明是不恰当的。许多酿酒师利用烛缸法或者 GasPak 系统成功地培养了乳酸菌，在 22 ~ 25℃ 厌氧条件下，培养 5 ~ 10d 就可以形成菌落。不同菌种培养时间不同，乳杆菌培养时间较短，小球菌（*pediococci*）和 *oenococci* 培养时间较长。

乳酸菌培养基是根据 Rogosa 苹果汁培养基（King 和 Beelman, 1986）和番茄汁 - 葡萄糖 - 果糖 - 苹果酸盐培养基（Izuagbe 等, 1985）设计的。无论是苹果汁培养基或者番茄汁血清培养基，都是为了提供所谓的番茄汁因子（见 2.3）。肝浸膏中有多种维生素，能够促进乳酸菌的生长，可以从 Sigma 公司购买。上述两种培养基除去放线菌酮后都是酵母选择性培养基。精氨酸异型发酵培养基（Pilone 等, 1991，见 13.6.6）被用来研究乳酸菌的生理生化特征（见 15.4.1 和 15.4.5.2）。

13.6.1 Rogosa 苹果汁培养基

1. 称取 1g 肝浸物，或者动物肝脏，加 100mL 蒸馏水煮 30min，用瓦特曼 1 号（Whatman 1#）滤纸过滤。
2. 称取下列物质：
- 胰蛋白胨20g

蛋白胨5g

酵母抽提物5g

葡萄糖5g

苹果汁200mL

吐温 - 80 [5%（质量分数）溶液]1mL

蒸馏水700mL
3. 混合、溶解前面所有成分，用 50%（体积分数） H_3PO_4 和 6mol/L KOH 调 pH 到 4.5。
4. 加 20g 琼脂，溶解，121℃ 灭菌 15min。
5. 如果培养基用于筛选酵母，称取放线菌酮 100mg，溶解在 10mL 蒸馏水

中, 0.45 μ m 滤膜过滤除菌, 加入灭菌后还未凝固的培养基中。

13.6.2 番茄汁 - 葡萄糖 - 果糖 - 苹果酸盐培养基

1. 称取 1g 肝浸物, 加 100mL 蒸馏水煮 30min, 用 Whatman 1 号滤纸过滤。

2. 购买市售无防腐剂、非浓缩且只含盐的番茄汁, 或者从新鲜番茄中自制番茄汁, 取 250mL 番茄汁, 在 3000 \times g 离心 30min, 保留上清液, 在 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3. 称取下列物质:

胰蛋白胨	20g
蛋白胨	5g
酵母抽提物	5g
葡萄糖	5g
果糖	3g
番茄汁上清液	200mL
吐温 - 80 [5% (质量分数) 溶液]	1mL
蒸馏水	700mL

4. 混合、溶解步骤 1 和 3 的所有成分, 用 50% (体积分数) H_3PO_4 和 6mol/L KOH 调 pH 到 4.5。

5. 固体培养基加 20g 琼脂, 溶解, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15min。

6. 如果培养基用于筛选酵母菌, 称取放线菌酮 100mg, 溶解在 10mL 蒸馏水中, 0.45 μ m 滤膜过滤除菌, 加入灭菌后还未凝固的培养基中。

13.6.3 精氨酸异型发酵肉汤培养基

1. 取 Campbell's V-8 蔬菜汁, 3000 \times g 离心 30min, 保留上清液。

2. 称取下列物质:

胰蛋白胨	5g
蛋白胨	5g
酵母抽提物	5g
葡萄糖	5g
果糖	20g
L-精氨酸	6g
吐温 - 80 [5% (质量分数) 溶液]	1mL
蔬菜汁上清液	200mL
蒸馏水	800mL

3. 混合、溶解步骤 1 和 3 的所有成分, 用 50% (体积分数) H_3PO_4 和 6mol/L KOH 调 pH 到 4.5。

4. 121℃灭菌 15min。

13.7 醋酸菌培养基

Swings (1992) 提出用葡萄糖 - 酵母抽提物 - 碳酸盐培养基 (GYCM) 检测产酸的微生物, 并且被认为是醋酸菌的标准培养基 (De Ley 等, 1984)。由于碳酸盐的缓冲作用, 醋酸菌可以在 GYCM 培养基、4℃ 条件下生长一个月。甘露醇 - 酵母抽提物 - 蛋白胨培养基 (MPYP)、非选择性 WL 培养基和酵母抽提物 - 蛋白胨 - 乙醇培养基 (YPE), 最近被 Du Toit 和 Pretorius (2002) 等所描述, 都可以用来培养醋酸菌。

葡糖杆菌在 GYCM 培养基上生长 3~5 周就会产生水溶性的褐色色素, 而其他醋杆菌属细菌则没有此现象。在生长过程中, 醋杆菌所产生的酸分解培养基中的碳酸钙, 在菌落周围形成一个透明的水解圈。与乳酸菌不同, 醋酸菌是专性好养微生物, 生长在琼脂的表面。

13.7.1 葡萄糖 - 酵母抽提物 - 碳酸盐培养基

1. 称取下列物质:

葡萄糖	50g
酵母抽提物	10g
CaCO ₃	30g
蒸馏水	800mL

2. 溶解以上各物质, 补充水分到 1000mL。

3. 加琼脂 25g, 121℃灭菌 15min。

13.7.2 甘露醇 - 酵母抽提物 - 蛋白胨培养基

1. 称取下列物质:

甘露醇	25g
酵母抽提物	5g
蛋白胨	3g
蒸馏水	800mL

2. 溶解以上各物质, 补充水分到 1000mL。

3. 加琼脂 25g, 121℃灭菌 15min。

13.7.3 酵母抽提物 - 蛋白胨 - 乙醇培养基

1. 称取下列物质并混合:

酵母抽提物	10g
-------	-----

蛋白胨	5g
蒸馏水	800mL

2. 溶解以上物质, 调 pH 到 5.5。
3. 加琼脂 15g, 121℃ 灭菌 15min。
4. 取 20mL 乙醇加入 200mL 蒸馏水中, 0.45μm 滤膜过滤除菌, 加入灭菌后还未凝固的培养基中。

13.8 无菌接种技术

将微生物从一个容器转移到另一个容器, 并在此过程中不被污染, 这对试验成功至关重要。为制备种子液或长期保存菌种, 都需要采用无菌接种技术。一般用接种环将微生物接种到培养皿和斜面的琼脂表面, 接种针经常用作穿刺接种。它们一般用明火加热灭菌 (图 13.1)。

13.8.1 固体培养基之间的接种

13.8.1.1 从斜面或穿刺培养物接种

1. 单手持含有目标微生物的斜面试管。
2. 将接种环或接种针在火焰上烧红变红, 然后轻轻接触无菌琼脂表面冷却接种环或接种针。
3. 用持有接种环或接种针的手拔出试管塞, 用火焰灼烧试管口, 然后用接种环或接种针在琼脂表面或穿刺线上挑取少量的微生物。

4. 抽出接种环或接种针, 再次灼烧试管口, 塞上试管塞。

5. 立即接种微生物到新鲜的斜面或穿刺培养基中 (见 3.10.1)。斜面接种时, 接种环在试管底部的琼脂斜面划线, 随后退出试管口; 穿刺接种时, 直接将接种针从培养基中央刺入, 然后取出接种针。

6. 再次对接种针或接种环火焰灭菌。

13.8.1.2 从培养皿接种

1. 将含有目标培养物的培养皿放置在易拿取的位置。
2. 单手持接种环或接种针在明火上灼烧灭菌, 一手将培养皿打开一条缝, 一手用接种环或接种针接触培养皿中没有菌落的琼脂 (冷却接种环或接种针)。注意, 不能将培养皿的盖子全部打开, 防止空气中微生物的污染。
3. 用接种环或接种针挑取单菌落。

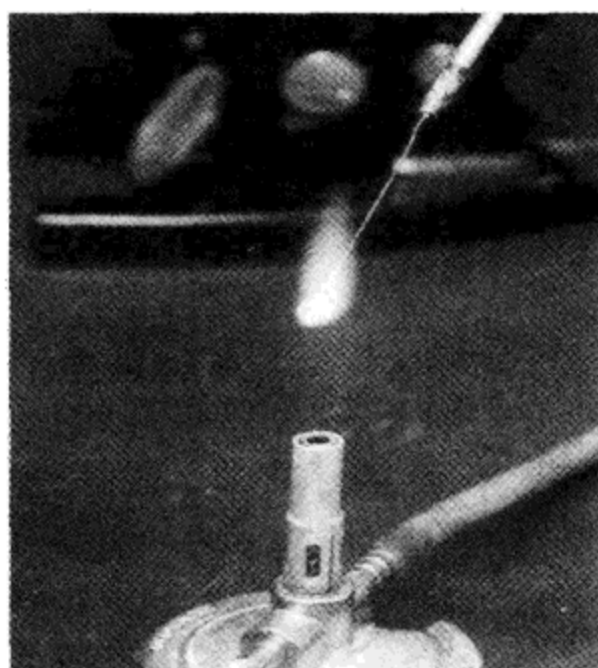


图 13.1 接种环在酒精喷灯上热灭菌
(照片使用获得 WineBugs LLC 许可, 下同)

4. 取出接种环或接种针，盖上培养皿的盖子。
5. 在新鲜的培养皿或斜面上划线接种（见 13.10.1）。斜面试种时，接种环在试管底部的琼脂斜面划线，随后退出试管口；穿刺接种时，直接将接种针从培养基中央刺入，然后取出接种针。
6. 再次对接种针或接种环火焰灭菌。

13.8.2 从固体培养基到液体培养基的接种

1. 灭菌接种环或接种针，方法同前。
2. 从斜面、培养皿、穿刺培养基上挑取单菌落。
3. 另一手持盛有经过灭菌的培养基的试管。
4. 持有接种环的手拔出试管塞。一些微生物学家建议用该手的无名指和小指夹住试管塞，其余手指夹住接种环。
5. 火焰灼烧试管口，将接种环浸入液体，在试管内壁摩擦接种环将菌体接入培养基。
6. 取出接种环，灼烧试管口，塞回棉塞，再次灭菌接种针或接种环。

13.8.3 从液体培养基到固体培养基的接种

这个接种过程比固体培养基到液体培养基的接种稍复杂，在微生物计数中被广泛使用。用一个移液管吸取一定体积的培养物到空白容器稀释，或加入培养皿中涂布（见 14.3）。也可以用无菌、干燥的滴管吸取液体（见 18.7）。

为了防止液体培养基被杂菌污染，打开前要灼烧试管口部位（图 13.2），这可以造成容器内部的正压，防止污染物进入试管中。

用过的移液管和器具应放置在消毒液中，随后进行高温蒸汽灭菌。移液管、培养皿等可反复使用的玻璃仪器，用过后不要随意丢弃，应该放在指定位置，或者用袋子包起来。

应该避免用嘴来吸移液管，虽然早期微生物学者采用这种方式，但是从安全角度考虑应禁止该操作。目前，有许多价格便宜、使用方便的移液装置可供使用。

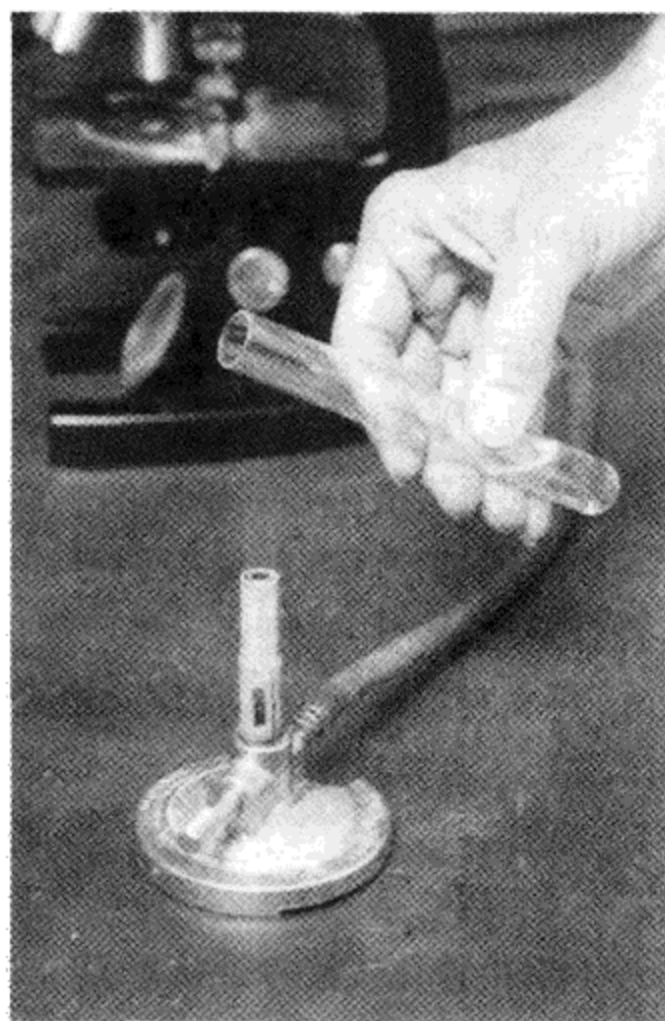


图 13.2 打开试管前加热试管口部位

1. 将培养液、经过灭菌的肉汤培养基或稀释试管放在试管架上相邻的位置。按照经验,实验者应该能用一只手的食指和中指同时持有两支试管,大拇指以支持作用。

2. 取一只无菌移液管放入移液装置中,不要触摸移液管的任何表面。

3. 用另一只手摇动试管,拔出塞子,灼烧试管口,插入移液管,吸取所需体积的培养基。

4. 然后重新灼烧试管口,塞紧棉塞,放回试管架。

5. 立即取出含有经过灭菌的培养基试管,拔出试管塞,火焰灼烧试管口。

6. 将移液管放在接近试管液面上方,放出液体。移液管中的最后一点液体,已经计算在内,不用吹出。如果将液体移入培养皿,移液管与培养皿成 45° 角,然后让液体流出。有些实验室在移液管中塞有棉花,因此要对移液管加压,使液体流出。操作时要小心,避免液体飞溅到培养皿的盖子和四壁。

7. 取出移液管,灼烧试管口,塞上塞子,移液管放入消毒液中。

13.9 微生物的分离

取一份葡萄醪或葡萄酒样品,在固体培养基上进行涂布,培养后在培养皿中会出现各种微生物菌落。从理论上而言,一个单细胞在培养后,通过不断繁殖形成一个单菌落。

由于样品中含有多种微生物,在培养后,会出现各种大小、形态、颜色等各异的菌落。为了分离这些微生物,一般采用非选择性培养基平板上划线分离的方法。通过连续划线分离,每个区域的微生物数量越来越少,增加了形成单菌落的几率。如果是能产生荚膜的酵母,经常会被细菌污染。因此,必须通过多次划线才能获得单菌落。

1. 右手拿接种环,在火焰上灼烧灭菌,轻触培养皿琼脂表面冷却接种环。

2. 按照13.8所述操作,打开培养皿盖子,挑取单菌落或多个菌落,按照图13.3中1所示放置接种环。

3. 接种环在琼脂表面轻轻按“Z”字划线(按1所示)。划线要尽可能紧密,最大程度利用平板表面。要避免接种环划破琼脂表面。

4. 完成步骤1后,盖上培养皿盖子,再次灭菌接种环。

5. 将培养皿反时针旋转 $1/3$,打开平板,将接种环接触琼脂表面以冷却。

6. 从图13.3所示位置2处开始划线,方法按照步骤3操作。除了最初的划线与前边的线交叉外,后边其余的线都不能交叉。

7. 从3所示位置开始划线,方法如前。

8. 在最适条件下,培养皿倒置培养。在三个划线区域,可以获得分开的单菌落,如图13.4所示。

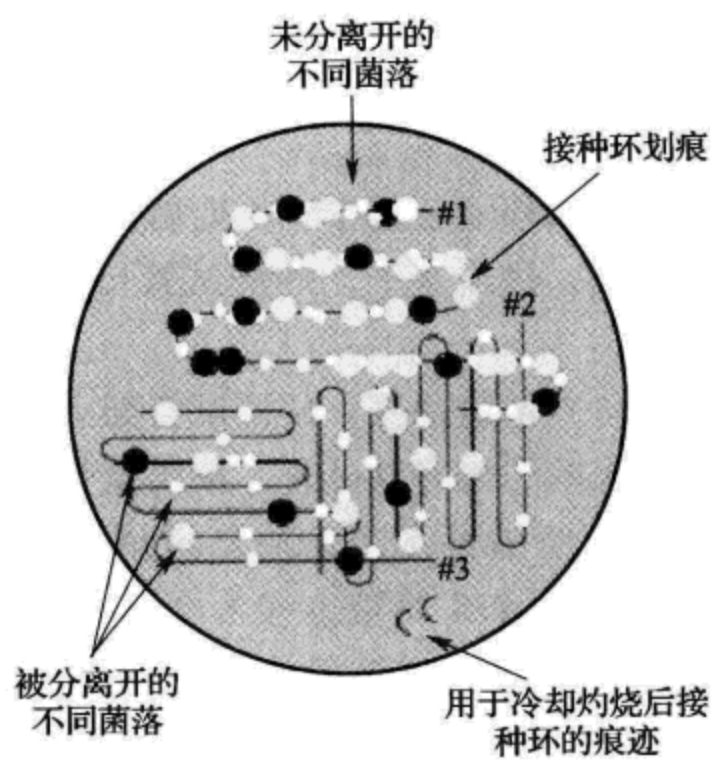


图 13.3 微生物分离划线方法示意图

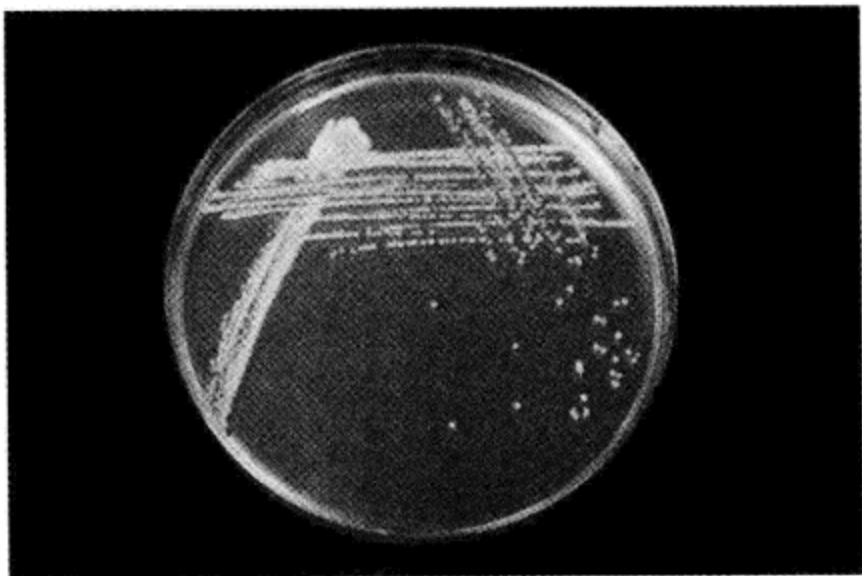


图 13.4 葡萄酒酵母划线分离平板（照片由 WineBugs LLC 公司提供、授权）

13.10 微生物菌种的保存

一般适宜采用固体培养基保存微生物菌种，斜面培养基或者穿刺培养基可以保存数周，在 -70°C 甘油管保存菌种，保存时间更长，可以达到数月。使用冷冻干燥技术，可以更长期保存微生物菌种（数年）。C. M. L. Joseph（2005，私人交流）使用 13.10.3 的方法，冻干保存酵母；Duke（1979）使用 13.10.4 方法保存乳酸菌。

13.10.1 斜面固体培养基或穿刺培养基制备

1. 选择适合保存微生物的琼脂培养基。
2. 加热培养基以溶解琼脂（溶液澄清，说明琼脂已完全溶解）。

3. 溶解后, 斜面培养基取 8mL, 穿刺培养基取 10mL 分装于 15mm × 125mm 试管中。

4. 塞上试管塞, 121℃ 高压蒸汽灭菌 15min。

5. 灭菌后, 塞紧试管塞。

6. 将试管倾斜放置, 制作斜面培养基。

7. 按照 13.8.1 的方法接种斜面培养基或穿刺培养基。

13.10.2 甘油悬浮管制备

1. 准备适宜微生物保存的肉汤培养基。

2. 挑取单菌落接种肉汤培养基, 在适宜条件下培养。

3. 离心收集菌体, 然后在无菌试管中加入少量的肉汤培养基。

4. 再次离心, 弃去上清液, 再加入少量肉汤培养基和 15% (体积分数) 的甘油, -70℃ 保存。

13.10.3 酵母菌冷冻干燥

1. 将下列器具灭菌:

a. 1mL 密封的冷冻干燥管。

b. 10mL 和 25mL 的具刻度移液管。

c. 250mL 带螺旋盖的离心瓶。

2. 在无菌试剂瓶中加入 10g 脱脂奶粉 (Difco) 和 2g 谷氨酸钠, 用 100mL 无菌水溶解, 110℃ 高压蒸汽灭菌 10min。

3. 取培养 3d、生长良好的斜面菌种。

4. 取一环菌种接种到灭过菌的 1mL 脱脂奶粉培养基中。

5. 从上述处理后的培养基中取出 200μL, 加入 1mL 冻存管中。

6. 抽真空后快速冷冻干燥, -20℃ 保存。

13.10.4 乳酸菌冷冻干燥

1. 将下列器具灭菌:

a. 30mL 血浆瓶 (用铝箔包裹, 高压蒸汽灭菌)。

b. 血清瓶灰色隔膜 (装入大烧杯中, 用铝箔包裹, 高压蒸汽灭菌)。

c. 10mL 和 25mL 具刻度移液管。

d. 250mL 带螺旋盖的离心瓶。

2. 制备适宜的肉汤培养基, 每支试管分装 10mL; 1000mL 带螺旋盖的三角烧瓶在 121℃ 高压蒸汽灭菌 15min。

3. 缓冲液 A:

称取 1.11g NaH_2PO_4 、11.27g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 加 800mL 蒸馏水溶解, 定

容至 1000mL，调整最终 pH 到 7.5。

4. 缓冲液 B：

称取 2.22g NaH_2PO_4 、22.54g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，加 800mL 蒸馏水溶解，定容至 1000mL，调整最终 pH 到 7.5。

5. 制备 Naylor - Smith 悬浮培养基：

a. 称取 40g 糊精、10g NH_4Cl 、10g 硫脲，加 800mL 蒸馏水溶解，转移到 1000mL 带螺旋盖的烧瓶中，121℃ 高压蒸汽灭菌 15min。

b. 称取 10g 抗坏血酸，加 200mL 蒸馏水溶解，0.45 μm 滤膜过滤灭菌，无菌操作加入 a 灭菌溶液中。

6. 挑取单菌落接种试管肉汤培养基，适宜条件培养。

7. 取培养好的试管菌种，接入 500mL 肉汤培养基中，同样条件下培养。

8. 3000 $\times g$ 离心 30min，收集细胞。

9. 倾去上清液，取 25mL 缓冲液 A 悬浮细胞，再次离心。

10. 倾去上清液，取 25mL 缓冲液 B 和 25mL Naylor - Smith 培养基悬浮细胞。

11. 用 10mL 移液管吸取 5mL 菌悬液，加入血清瓶中。无菌隔膜包裹，确保隔膜没有完全插入瓶中（在冷冻干燥时，隔膜的沟槽允许水流出）。

12. 在 -20℃ 或更低温度下冷冻，开始阶段尽可能快速地降温。真空密封血清瓶，-20℃ 保存。

第 14 章 菌落密度测定

14.1 引言

在葡萄酒酿造的各个环节过程中，推测菌群浓度和多样性起到了非常重要和关键的作用。比如，在种子液的制备、苹果酸-乳酸发酵的增长与衰亡阶段以及判断是否存在潜在的酒香酵母污染时，考察菌群密度的变化通常是非常必要的。

菌群密度可以用多种方法进行测量。其中最重要的三种为显微镜计数（见 14.4）、平板计数 [又名倾注或涂布平板法（见 14.5）]，以及膜过滤法（见 14.5.3）。显微镜计数最便捷，但是要求每毫升中至少含有 10^4 个细胞。当菌群密度较小无法用显微镜检测时，一般直接使用平板计数法。通常，这些方法都要求样品稀释后涂布，并且要花费一定时间进行培养。继平板计数法后，可以使用膜过滤法，它用于活菌浓度非常低的情况（ <25 个细胞/mL）。此法中，先用滤膜将细胞浓缩，再转移至固体培养基上。生物荧光法（见 14.6）是另一个常用的快速计数方法，常用于清洁消毒程序中的效能检测。另外，微生物数量还可以用分光光度计或者浊度测定仪（见 14.7）来检测。这些仪器要求菌群密度高，这点往往限制了它们在常规使用中的有效性。

14.2 取样

为检测活菌数量，获得均匀的样品非常重要。因此，在取样前罐或酒桶中的样品必须搅拌混匀后再取样。或者，取样前如未混匀，可以分别取罐或者酒桶表面、中间和/或底层的样品。后一种方法对检测更加有利，因为根据代谢需求的不同，微生物会在罐或酒桶中自主分层。例如，醋杆菌属好氧菌，多处于葡萄酒表层。若取样前将整个系统混匀，醋杆菌就会分布在整个体系中。这样，单位体积酒样中微生物数量会降低，根据桶的大小以及其中细菌数的多少，所取样品中某些微生物数目就可能低于检出限。这种情况下，从葡萄酒表面取样可以最大量地测定微生物。

如果可能的话,用于微生物分析的样品(50~100mL)应该进行菌落分离,然后将纯种接入灭菌容器中,以防止非葡萄酒酿造微生物的二次污染。可以通过罐上的取样口,用葡萄酒取样器取样。用于取样的器具使用前需要灼烧或用70% (体积分数) 酒精溶液消毒。使用消毒剂消毒的取样器在使用前,还需要用无菌水漂洗。

在消毒检测时,传统的设备表面取样的方法包括用灭菌后的棉签擦拭取样部位,然后对粘着到棉签上的微生物进行计数。根据这些微生物计数培养基的不同,一个严格清洗和灭菌过的部位不得含有超过100个的单菌落。与直接抽样检测的方法比较,生物荧光法可以更快地得到结果(见14.6)。Sveum (1992) 所列过程如下:

1. 打开经过灭菌的装有棉签的容器,抓住棉签末端。不要触碰到棉签的其他部分,因为这些部分将要伸入内含灭过菌的9mL 1g/L 蛋白胨的18mm × 150mm 试管中。
2. 将灭菌溶液在无菌环境中打开,湿润棉签头部,在溶液内部转动棉签,拿出时挤出多余溶液。
3. 呈30°角握住棉签,将棉签在50cm²的表面上来回摩擦三次取样。
4. 将棉签插入灭菌溶液中,浸润棉签头部,在溶液内部转动棉签,挤出多余溶液,以洗下所取微生物。
5. 在至少4个50cm²的表面上取样,重复步骤3和4。
6. 取样后,将棉签头部置于试管中,用灭菌剪刀剪去多余部位,而将棉签头部留在试管中。
7. 将试管充分混匀,用合适的方法和培养基对存在的微生物进行计数(见14.5)。如果菌落数量很少,则将含有样品的所有溶液通过灭菌滤膜浓缩,再进行进一步培养(见14.5.3)。

14.3 样品的稀释

在计数之前,如果由于样品中菌群数量过大而导致无法进行有效计数时,需要对样品进行稀释。用于稀释样品的溶液被称为“稀释空白液”。稀释样品时通常采用1g/L的灭菌蛋白胨溶液,也可以用其他一些培养基,例如8.5g/L生理盐水或Butterfield磷酸缓冲液(Swanson等,1992)。应避免使用灭菌蒸馏水作为稀释溶液,因为其对菌株渗透压的影响会减少细胞的存活量。一般使用可灭菌的带金属或聚丙烯瓶塞的18mm × 150mm 灭菌试管来配制稀释空白液。避免使用带棉塞的试管。

稀释梯度时,最小的稀释倍数为10倍(1mL样品+9mL稀释溶液,1:10或10⁻¹)。实际操作中,在无菌状态下,将1mL样品转移至含有9mL稀释溶液的

试管中。更高的稀释倍数是将稀释后的样品依次以 1:10 稀释，如图 14.1 所示。例如，以 1:100 稀释可以经过 2 次连续 1:10 的稀释实现。当然，1:100 稀释也可以将 1mL 样品加入 99mL 稀释液中。比如牛奶稀释瓶。虽然用多次小稀释倍数进行稀释代替较少次数的大稀释倍数稀释（如：4 次 1:10 稀释与 2 次 1:100 的稀释）可以降低实验误差，但是这样需要花费更长的时间，更多的试管以及更多的稀释液，所以在实际操作中并不可行。由于灭菌后培养基体积会少量损失，有的实验者在灭菌前调整稀释空白液的体积，在试管中加入略微多于 9mL 的稀释液（9.1mL 或 9.2mL），以希望保证灭菌后的稀释液的终体积更加接近 9mL。

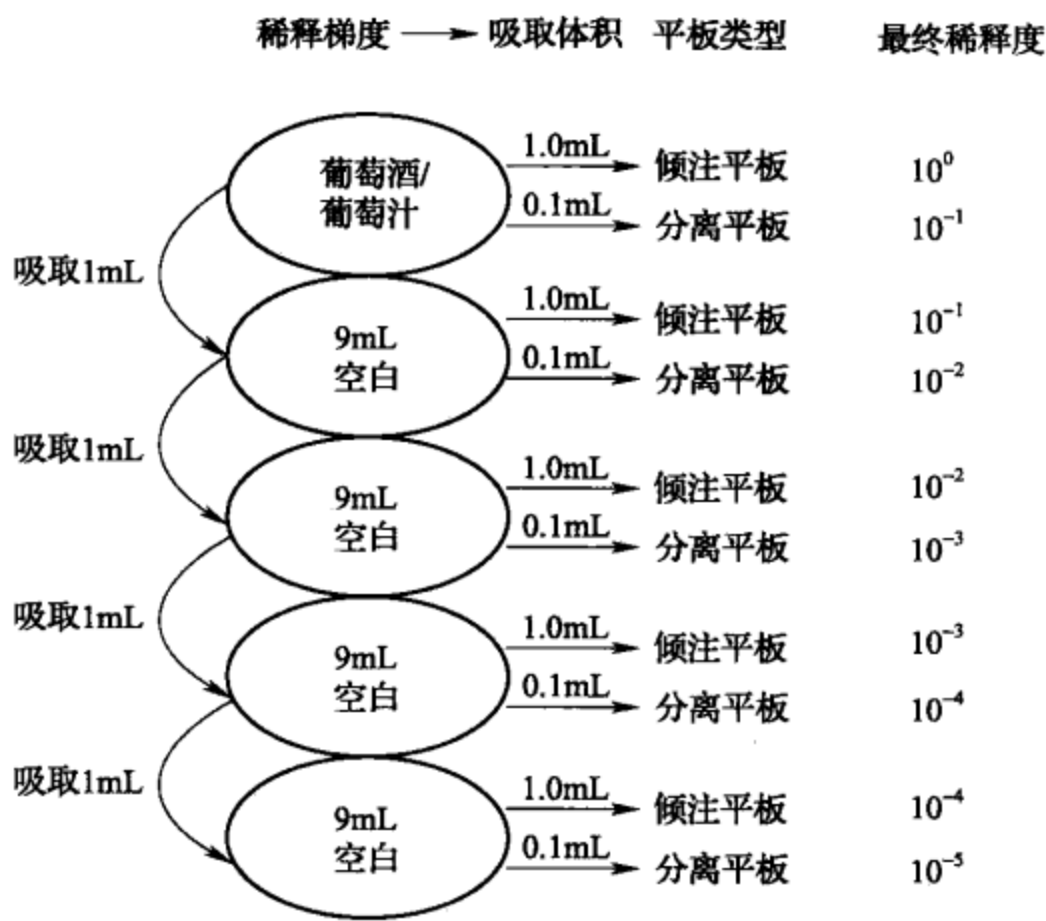


图 14.1 微生物计数的稀释梯度表

在准备稀释梯度时，保持无菌状态非常重要（见 13.8）。例如，转移样品时，装有稀释空白液的试管口必须经过灼烧灭菌（见 13.2）。必须使用灭菌的 1.0mL 移液管（0.1mL 刻度）或者可变体积的、配有灭菌塑料枪头的移液枪在各个梯度之间转移液体。灭菌的移液管或移液枪枪头只可以用 1 次，以后的操作都要换新的无菌移液管或移液枪枪头。移液枪要用 70%（体积分数）酒精进行表面擦拭消毒，并且每年要进行精度校准。

稀释过程中会遇到一个问题：存在潜在的细胞结块现象。例如，片球菌中某些酵母会分泌一种黏液使细胞结块，导致几个至 20 个或以上的细胞聚集在一起。除非使用物理方法进行分散，否则这些细胞结块就会给固体平板计数和数据的统计描述带来困难。为了将细胞结块带来的误差降到最小，在梯度稀释过程中，每次转移液体之前必须充分混匀后才能进行下一步稀释。

14.4 直接细胞计数

细胞计数方法包括明视野、相差和荧光显微镜计数等，常用于菌群密度估量，有时还可用于菌落初步鉴定。葡萄汁或葡萄酒滴在一特别设计的血球计数板上来统计，如图 14.2 所示，将盖片盖在上面，计数板腔中的溶液容积恒定，通过计数板上特定计数格中菌数的统计，可以很容易地计算其中的细胞数量。

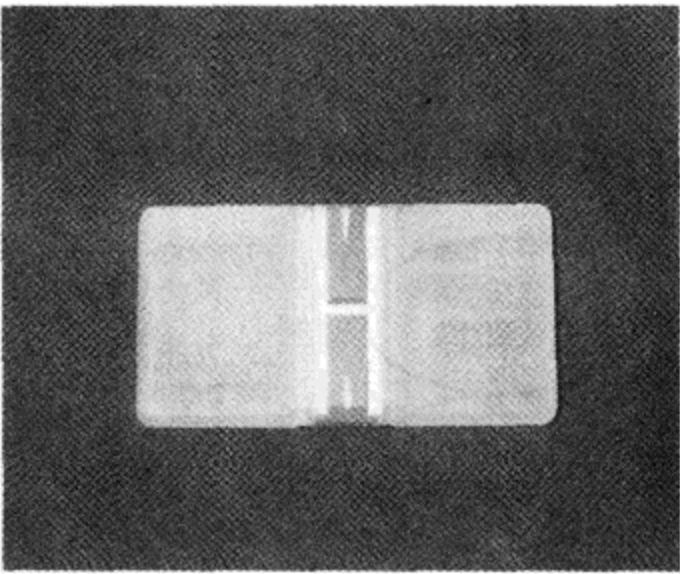


图 14.2 血球计数板

这种方法虽然快捷，但是由于计数板中腔容积很小，它要求菌群浓度必须至少为 10^4 个/mL 才能计数。由于这个局限，只有初始样品和随后发酵过程中菌群密度超过 10^6 个/mL，才能使用该方法。

用显微镜直接计数的另外一个难点是它同时显示活细胞与死细胞。根据样品中细胞在生长周期中所处的阶段不同，以及该样品的历史不同，样品中所含的活、死细胞比例差异很大，这使得显微镜直接计数得出的结果与平板计数结果难以比较。因为这个原因，平板计数法得出的菌数比显微镜直接计数得出的少。可以单独或结合使用染色剂和染料进行细胞染色来显示活、死细胞的差异（见 14.2，14.3，14.4）。

14.4.1 运用血球计数板计数

血球计数板的计数区域被细隔线切割分成 9 个大方格，每个方格面积为 1mm^2 （图 14.3）。中心计数区域（即 5 号大方格）又被均匀分割成 25 个中方格，每个中方格又被均匀分割为 16 个小方格。一些微生物学家计数

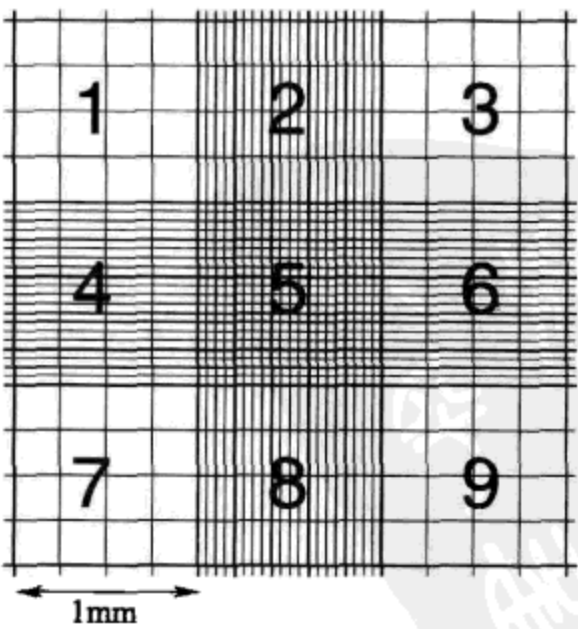


图 14.3 采用显微镜观察的血球计数板典型的计数格

时仅仅只用中心的5号方格,而另外一些实验者也用其他方格(1,3,7,9号大方格)。因为血球计数板的盖片距腔底的精确距离为0.1mm,每个大方格内的溶液体积为 0.1mm^3 或 $0.1\mu\text{L}$ 。

血球计数板中有2个计数区域,均可以容纳一定体积的液体(图14.2)。将移液管放在V形凹槽中,通过毛细管渗透作用使溶液渗透入计数槽中,从而使槽中充满果汁或酒样。样品充满计数区域后,便可以开始计数。为得到最佳的计数结果,细胞数应在20~50个范围内(图14.3)。只要知道原始溶液的稀释倍数以及用于计数的溶液体积,就可以推算出原始样品中的菌群密度(个细胞/mL)。

为了提高准确性,需对同一血球计数板上的2个计数区域及其足够数量的方格进行计数。至少要统计600个细胞(Splittstoesser, 1992)。最重要的是,计数时处于计数方格边界上的细胞是否记入细胞总数,对此各个实验室可以自行规定。根据稀释倍数的不同,对上述问题没有明确统一对微生物实际数量的准确性会有很大影响。

确定规则时得出的结果可能会与实际结果偏差较大。一个解决方法就是将处于方格上边界和右边界上的细胞计入,舍弃计算处于下边界和左边界上的细胞。另一个方法就是规定压界的细胞均计入或者均不计入。

当需计数的样品几乎不含细胞或者细胞浓度非常低时(如灌装流水线上的葡萄酒),在显微镜计数前需要用滤膜($<0.45\mu\text{m}$)将一定体积的细胞浓缩。

1. 用9mL稀释空白液和样品充分混匀,准备合适梯度的待测样品。

2. 将血球计数板上的盖片盖在计数槽上。

3. 如果计数前需要进行细胞染色,必须将样品和染色液混合均匀。记录体积和特定的稀释参数。

4. 使用移液管将稀释或未稀释的样品滴1滴于血球计数板上每个待测表面的输液槽(V形凹槽)内,通过毛细管渗透作用,盖片下的样品溶液将均匀渗透入计数区域中。或者,将最终稀释液直接滴1滴于计数方格中,之后盖上盖片。尽管这种方法也可行,但盖盖片时要非常小心,避免在计数区域内出现气泡。另外,溶液未充满计数方格或者溢出计数槽都是不行的。

5. 使用显微镜时,可以选择 $40\times$ 或 $100\times$ 的物镜放大倍数,统计足够量的方格中的细胞数,使细胞总数约600个。分别统计血球计数板上的2个计数区域的细胞数,再相加取平均值。

6. 计算公式:

$$\text{原始样品菌数 (细胞个数/mL)} = \frac{\text{计数区域内的平均细胞数} \times \text{用于计数的溶液体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{计数区域体积}}$$

7. 样品计算举例:分析未稀释的葡萄酒样品,统计一块血球计数板的2个计数区域内,5号大方格中的25个中格内其中5个中方格的细胞数,为135个

和 141 个。计算酒样中的细胞数量时,先用平均细胞数 (138) $\times 5$, 得到 5 号大方格中的细胞总数 (690 个), 再 $\times 10000$ (0.1 μL 或 0.0001mL 样品体积)。所以, 酒样品中的细胞总数为 6.9×10^6 个细胞/mL。

14.4.2 亚甲基蓝

根据氧化还原状态的不同, 亚甲基蓝也存在氧化态和还原态: 还原态时显无色, 氧化态时显蓝色。如果活酵母细胞被染色后, 亚甲基蓝被还原为无色, 这样细胞在蓝色背景下显无色 (或白色), 因此, 酵母细胞能够将染料还原为无色时, 则被认为是具有活力的生物, 如不能将亚甲基蓝还原, 则呈现蓝色或黑色。

虽然亚甲基蓝被应用于传统的酿造和葡萄酒生产工业中, 但是一些研究者不建议使用亚甲基蓝染色法来确定酵母的活力。比如, O'Connor - Cox 等 (1997) 发现亚甲基蓝不能将样品中所有的死细胞染色, 这样得出的活菌数就会偏高。

尽管亚甲基蓝存在几种化合物形式, 但生物实验中使用的是氯化亚甲基蓝。亚甲基蓝硫氰酸盐作为牛奶测定中的氧化还原指示剂, 但是它不能用作生物染料。亚甲基蓝会很快显示出对微生物的毒性, 因此镜检的准备工作必须在 10min 内完成。

1. 柠檬酸缓冲液的制备: 将 2.4g 柠檬酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 和 2.1g 柠檬酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 溶于少量蒸馏水中, 将缓冲液定容至 100mL, 如可能调 pH 至 4.6。

2. 将 0.3g 氯化亚甲基蓝溶于 30mL 95% (体积分数) 甲醇溶液中。

3. 加入 100mL 柠檬酸缓冲液至步骤 2 中的氯化亚甲基蓝溶液中。

14.4.3 胭脂红 - S

胭脂红 - S 是常用的细胞周质蛋白质的染色剂, 它不能区分活、死或即将自溶死去的细胞。针对这个问题, Kunkee 和 Neradt (1974) 认为由于胭脂红 - S 可以将活、死细胞全部染色, 可以先用亚甲基蓝染色, 镜检后, 再用胭脂红 - S 进行染色。

将 0.9g 胭脂红 - S, 13.4g 水杨酸和 13.4g 三氯乙酸溶解于 72.3g 蒸馏水中。

14.4.4 Woford 法染色

Woford 染料是通过镜检湿片 (见 12.5) 来检测活酵母 (McDonald, 1963)。活细胞无法染色而呈现无色, 死细胞可以被 Woford 染料染色, 呈现深红或紫红色。

1. 准备 North 染料:

a. 向 95% (体积分数) 甲醇溶液中加入足够的亚甲基蓝, 制成饱和溶液 (至少 1.5g 亚甲基蓝/100mL)。

- b. 将3mL苯胺油溶入10mL 95% (体积分数) 甲醇溶液中, 装于100mL容量瓶。
- c. 向步骤b的溶液中小心地加入1.5mL 12 mol/L HCl, 边加入边搅拌, 再向其中加入30mL饱和亚甲基蓝溶液。
- d. 用蒸馏水定容至100mL。
2. 碱性品红溶液的制备:
 - a. 将1g碱性品红溶于盛有95% (体积分数) 甲醇溶液的100mL容量瓶中。
 - b. 用95% (体积分数) 甲醇溶液定容至100mL。
3. 取10mL North染料和2mL碱性品红溶液于100mL容量瓶中, 用蒸馏水定容至100mL。
4. 将染料过滤, 冷冻保藏 (最长保藏时间为3~4周)。

14.5 直接平板计数

在直接平板计数时, 将已知体积的葡萄汁或者葡萄酒样 (0.1~1.0mL), 与合适温度的琼脂培养基混合之后, 倾注于预先灭菌的培养皿中 (平板倾注法), 或涂布于预先倾倒好的固态琼脂培养皿中 (平板涂布法)。在特定温度下培养一定时间后, 理论上原始样品中每个细胞均可以利用培养基中的营养物质生长。最终, 长成肉眼可见的单菌落可供计数。根据平板上长出的单菌落个数以及样品的稀释倍数, 可以计算得到每毫升样品中的细胞个数。该值通常被表示为“个单菌落/mL”或“CFU/mL”, 而不用“个细胞/mL”。用“CFU”这个词语是因为葡萄酒中的许多微生物不是以单细胞的形式存在的, 它们会以细胞二聚体、四聚体或短链的形式存在。因此, CFU可以更加准确地反映细胞是如何计数的。

一般在可以计数的平板上长出的单菌落数必须在25~250个 (Swanson等, 1992), 也有一些微生物学家认为30~300个菌落也可。所以, 每毫升含10000个细胞的葡萄酒样必须稀释100倍, 使每毫升稀释酒样中含有接近100个菌落数量。所需的稀释倍数可以用显微镜粗略地观察计数来确定 (表14.1)。

平板倾注法和平板涂布法均可以用于统计葡萄汁或葡萄酒中的微生物数。事实上, 可以购买商业化的试剂盒来进行计数, 试剂盒中含有预先配制并灭菌的琼脂平板和其他试剂材料。这样, 即使最小的酒厂也有能力自主进行该实验。然而, 这两种方法都有准确性和评价方面的问题。例如, 一般需要将同一样品的3个连续梯度 (2个平行样) 的稀释液涂布或倾注平板, 选出统计学上最合适的梯度。但如果是倾注平板, 生长在琼脂中间的单菌落就很难再利用或者转移了。

表 14.1 使用平板法分离微生物时估算的稀释度

显微镜视野内的细胞数 (1000 ×)	可能的数量/ (细胞数/mL)	估算的稀释度
1 ~ 10	$10^4 \sim 10^5$	$10^{-3} \sim 10^{-2}$
10 ~ 100	$10^5 \sim 10^6$	$10^{-4} \sim 10^{-3}$
> 100	$> 10^6$	$10^{-7} \sim 10^{-4}$

14.5.1 倾注平板法

与平板涂布法相比,倾注平板法的准备过程相对简单,且可以得到分散更好的单菌落。一些微生物在低氧状态下生长更好,因此这些微生物在琼脂层下部生长更好(倾注平板法),而对一些好氧微生物(如醋杆菌)来说,采用涂布法则生长更好。

成功制备倾注平板时需要在琼脂温度降低至凝固点之前琼脂完全呈液体状态时,完成菌体细胞的混入、分散和平板倾倒。所以,琼脂需“保温”。一般在倾倒平板之前,可以将琼脂保持在高于琼脂凝固点的环境中。在略低于 40°C 时琼脂凝固,直到温度升高至 $90 \sim 100^{\circ}\text{C}$ 时琼脂才能再次融化。在倾倒平板之前,为了保持琼脂的液体状态,给予包括倾倒平板等操作步骤足够的时间,可通常采用水浴将琼脂维持在 $45 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 的范围内。虽然培养基可以在更高温度时就倾倒,但是过高温度的可能会导致存在的微生物热休克随之死亡。

1. 参照表 14.1,准备好一系列的 9mL 稀释空白液。梯度稀释葡萄汁或葡萄酒样品,样品加入稀释空白液后要充分混匀后,才能转移至下一个梯度稀释液。

2. 从各稀释梯度中取 0.1 或 1.0mL 稀释液至灭菌的培养皿中。

3. 高温灭菌后,迅速将琼脂培养基放至 $45 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中,当琼脂温度和水浴锅温度平衡后,在无菌状态下,向每个培养皿中倒入 25mL 左右琼脂(若使用的是小平板,则琼脂量也要相应减少)。

4. 运用“八字形”手势小心将平板混匀。一般静置冷却至少 1h,以保证琼脂凝固均匀。

5. 将平板倒置,置于适宜温度培养一定时间。

6. 培养完成后,选择可视单菌落数处于 25 ~ 250 个的平板(稀释的平板),统计平板单菌落总数。

7. 计算:将步骤 6 中计算得到的单菌落总数 \times 稀释总倍数(稀释倍数和平板中样品的体积量)。

8. 计算举例:如果 10^{-3} 稀释度的平板具有 104 个可视单菌落,则统计得原葡萄汁或葡萄酒样品中活菌总数为 $104 \times 10^3 \text{ CFU/mL}$ 或 $1.04 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ 。

14.5.2 平板涂布法

平板涂布法通常用于好氧菌或热敏感微生物的计数。可以数天以前事先制

备用于涂布的平板。这个步骤利用弯曲的玻璃棒（“曲棍球棒”）来涂布一定体积的液体样品，使其均匀地分布在固态琼脂培养基表面（图14.4）。通常，用于涂布的菌液最大体积为0.1mL，这点和倾注平板不同，后者最多可以达到1mL菌液。这种方法同时也存在一些问题，它很难全部转移和分散单细胞，使它们分散形成可计数的单菌落。琼脂表面多余的水汽也会导致菌落分布不理想，给菌落计数带来困难。

1. 参照表14.1，准备好一系列的9mL稀释液。梯度稀释葡萄汁或葡萄酒样品，样品加入稀释液后要充分混匀后，才能转移至下一个梯度稀释液。

2. 从各稀释梯度中取0.1mL稀释液至含有适量固体琼脂培养基的培养皿中。

3. 握住涂布棒手柄，将其头部升入70%酒精中，火焰灼烧至涂布棒上的火焰熄灭，冷却。用涂布棒将菌液均匀涂布于平板上。

4. 将平板倒置，置于适宜温度培养一定时间。

5. 培养完成后，选择可视单菌落数处于25~250个的平板（稀释的平板），统计平板单菌落总数。

6. 计算：计算原始样品菌数量，将计算得到的单菌落总数 \times 稀释总倍数（样品的稀释倍数 \times 平板中样品的体积量）。

7. 计算举例：如果 10^{-3} 稀释度的平板具有86个可视单菌落，则统计得原葡萄汁或葡萄酒样品中活菌总数为 86×10^5 CFU/mL 或 8.6×10^6 CFU/mL。

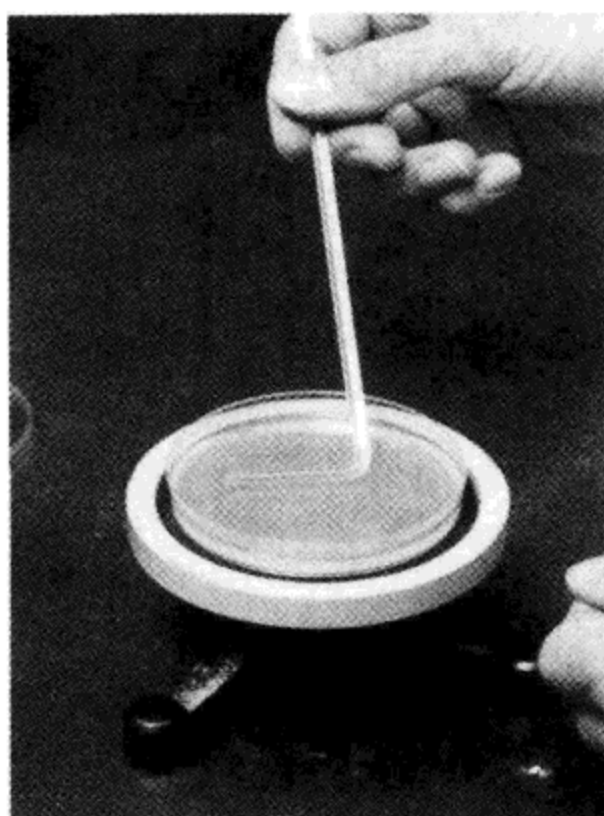


图14.4 采用玻璃“曲棍球棒”在固体琼脂表面均匀涂布液体样品

14.5.3 膜过滤

膜过滤是指一定体积的葡萄酒用孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 或者更小的灭菌滤膜过滤。过滤后，葡萄酒中的微生物均集中在过滤膜上面的一侧，在无菌状态下，将其转移至含有琼脂培养基的培养皿中。该方法针对不含微生物或者活菌数量很低的葡萄酒样（如罐装葡萄酒），这是因为这种酒样受检样品的体积很大。但是，如果酒样中存在固体颗粒时该方法不可用，这样会导致滤膜堵塞。

可供选择的膜过滤装置种类众多。一些装置使用单独包装好的预灭菌滤膜，在清洗、灭菌（高温消毒）后还可以重复使用。另一些一次性滤膜使用也很简单方便，有的甚至还配套有过滤装置以及培养皿。采用上述两种过滤装置，将

过滤好的滤膜转移至琼脂表面时一定要采取无菌技术。有些滤膜上还含有格线,这种滤膜对于显微计数非常有用。

从灌装流水线上所取的葡萄酒样,几乎不含或者含极少量微生物(< 5 CFU/1000mL)。要得到统计学上准确的计数结果,所需的葡萄酒样总量就显得很重要。根据检验,如果灌装时样品中菌落 > 10 个细胞/L,从750mL酒样只取100mL进行膜过滤分析,此时的计数结果可能不准确。

$$\text{例 1: } \frac{10\text{CFU}}{1000\text{mL}} \times 100\text{mL} = 1\text{CFU}$$

$$\text{例 2: } \frac{20\text{CFU}}{1000\text{mL}} \times 100\text{mL} = 2\text{CFU}$$

比较例1和例2,每个平板上“稳定性”和“再发酵潜力”的差别小于1CFU,这个数量可能不会被计数出来,选用相同的可接受水平,将整瓶葡萄酒(750mL)都进行膜过滤,所得的检测限要优于比只取100mL分析的结果。

$$\text{例 3: } \frac{10\text{CFU}}{1000\text{mL}} \times 750\text{mL} = 7.5\text{CFU}$$

$$\text{例 4: } \frac{20\text{CFU}}{1000\text{mL}} \times 750\text{mL} = 15\text{CFU}$$

虽然随着样品体积的增加,理论上认为检测样品中微生物的能力提高了,但每块平板上长出的单菌落数仍远低于每板25个菌落这一最低CFU值(见14.5)。为了达到25个单菌落/平板的数量,至少要膜过滤2500mL样品。因为这个原因,葡萄酒灌装流水线上通常装有在线取样器,进行连续取样。在线取样器里配备了膜过滤器,且每隔一定时间,可以拆卸更新。或者,酒厂可以从所给的取样范围中多过滤几瓶酒样。如果所取的样品是刚灌装好的酒样,一些酒厂选择将所取样品放置2~3d后再进行涂布,这样可以:(a)给予加入的杀菌剂(如 SO_2)充足的作用时间;(b)杀死样品中存在的非葡萄酒酿造微生物。

1. 从酒罐或酒瓶中取样,保持无菌。

a. 从酒瓶中取样:将瓶口擦拭消毒,将启瓶器置于70%酒精溶液中。点燃酒精溶液,将启瓶器和瓶口朝下,避免酒精烧伤手或衣服。

b. 从酒罐中取样:取样前,摇动酒罐,因为微生物会聚集在表面(如一些非酿酒酵母)或罐底(如乳酸菌)。最好将取样器在火焰上烧灼,并将所取酒样置于灭菌容器中。

2. 将打开的瓶口或盛放样品的容器在火焰上烧灼几秒钟后,立刻向过滤膜上倒入至少250mL样品。

3. 运用抽滤装置将所有样品进行过滤至下方的一个收集瓶。确保在灭菌过滤口与抽滤装置之间装溢流瓶,来收集多余的酒样。

4. 用火焰烧灼镊子,用镊子将过滤膜从抽滤装置中移走,操作保持无菌。

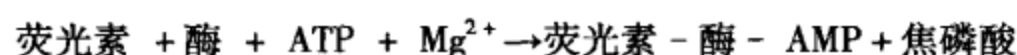
5. 将过滤膜（格面朝上）置于含有琼脂培养基的培养皿中，铺平，确保过滤膜与琼脂充分接触。如果过滤膜没有与琼脂充分接触，微生物则不能够生长。用灭菌的镊子轻轻挤压过滤膜，以赶走过滤膜下存在的气泡。

6. 培养平板，观察菌落的出现。

14.6 生物荧光

生物荧光是激发态时生物分子发出可被测定荧光的过程（Hartman 等，1992）。这个过程可被用来测定微生物代谢产物中 ATP 的量。理论上，测定 ATP 的量可以反映活细胞数量，因为活细胞数越多，产生的 ATP 量越多。单个酵母细胞产生的 ATP 量要多于单个细菌细胞产生的量，因此对酵母的检出限可以低至 10 个细胞（Hartman 等，1992）。作者等还进一步指出细菌细胞的实际检出限达到 1000 ~ 10000 个细胞。

荧光素 - 荧光素酶分析经常用于检测 ATP 的量，如下所示：



上述分析可以在几分钟内完成，因此荧光素 - 荧光素酶生物荧光技术已越来越多地替代传统消毒和平板计数法来检测无菌程度（见 14.2）。现在，又有一些生物荧光检测试剂盒投放市场。只要购买检测器后，每次测试只需包括样品收集容器、消毒和其他试剂的费用，价格便宜。虽然该方法已被应用于酒精类和非酒精类饮料的生产中（Thompson, 2000），但是通过检测 ATP 的量来推算活细胞的量存在一个很大的弊端（Hartman 等，1992）。微生物种类不同以及同种微生物所处的生理状态不同（如受伤状态、饥饿状态等），ATP 的产生量相差很大。而且，该方法不能分辨由酵母或是别的微生物产生的 ATP，使实验结果难以诠释。

14.7 比浊法和光密度

一直以来，分光光度计与浊度测定仪被微生物学家用来快速检测细胞密度和特定化合物浓度（如颜色、苹果酸等）。分光光度计是检测光通过某种样品溶液后被吸收或是通过的光强度，浊度测定仪测定的是光的散射程度。如图 14.5 所示，分光光度计接收通过的光（420nm 或者 650nm）与光源处在同一条直线上，而浊度测定时需与光源垂直。要事先绘制好吸光值和细胞密度或其他一些参数的标准曲线，才可以通过测定吸光值推算出未知样品的细胞密度等。因此一个成功的应用就是需要用其他计数方法来校正吸光度，最常用的就是直接平板计数法（见 14.5）。

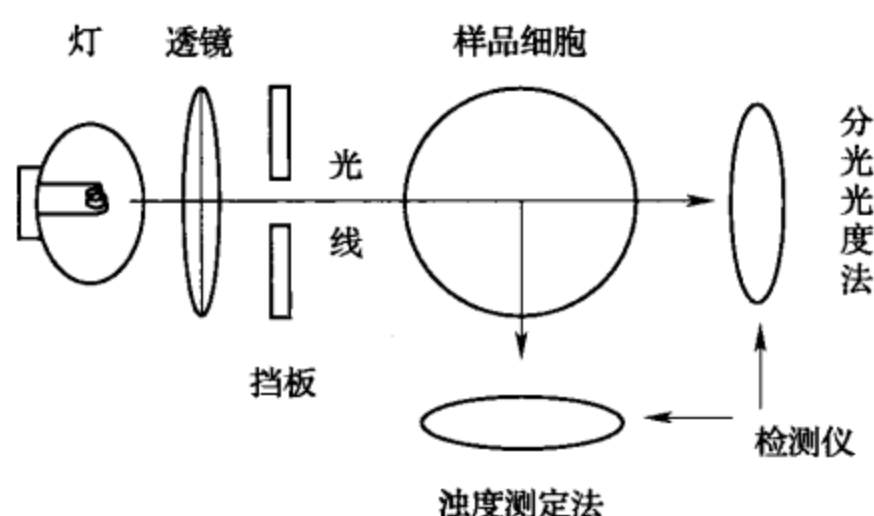


图 14.5 分光光度计与浊度测定仪设备示意图

分光光度计中吸光度的测定常用光波长为 420nm 或 650 nm

用分光光度计或者浊度测定仪测定细胞数的准确性取决于以下几个因素。因为酵母等大细胞吸收的光量远远大于细菌等小细胞，因此不同的微生物需要建立不同的标准曲线进行换算。另外，酵母细胞易聚集，尤其在发酵后期更加明显，这也会大大影响吸光值。在灵敏度方面，分光光度法与浊度测定法相比，对悬浮液的密度要求更高。比如，分光光度法的最小检出限也可以非常高，达到 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL (Parish 和 Davidson, 1993)。不过，虽然浊度测定法比较适合于测定光散射程度来推算微生物悬浮液密度，但该仪器却不常用。

第 15 章 葡萄酒酿造微生物鉴定

15.1 引言

生物学家运用一种鉴定系统对微生物进行分类，这种分类是基于微生物生理生化特点的相似程度，因此也称为分类学。早期分类包括比较细胞的表观形态特点，例如细胞形态（细胞形态学），以及各种粗制的碳氮源底物的应用。现在包括特定的生理生化特点、基因序列，以及免疫化学应答（见第 16 章）在内的其他细胞形态学特征也变成分类依据之一。

生物分类学中最基本的分类单位是种。经典生物学中对种的描述为一大类可进行自我繁殖、与其他相似的微生物不能进行杂交的群体。尽管这个定义用来描述生命周期中存在规律性的有性状态的微生物比较准确，而用来形容以无性方式自主繁殖的微生物时就显得不那么清晰了。因此，在酵母和细菌之间用种的概念就很难描述。虽然细菌学家依然运用种的概念来进行分类，但它的意义已经被扩展到包括（可能地）许多相似的菌株。理论上，一株菌包括单个细胞的所有子孙后代。这样，菌株这一概念就包括一系列表型很相似的菌株的集合，它们仅存在一些“次要”的生理特征差异。一个很好的例子就是：酒酒球菌包括人们熟知的几种菌株：ML-34，PSU-1，Viniflora 和 EQ-54。

从葡萄酒微生物信息或者利用遗传测序出发，存在一个重要的争论，即微生物之间差异的程度是否达到了菌种或菌株的差异。而今，随着分类学家越来越多地依赖于基因水平上的相似性，微生物之间的关系变得既清晰又模糊。当新的关系被确定，微生物分类学也随之发展。分类时可参照最新版酵母、细菌和霉菌分类手册，包括《酵母》、《伯杰氏系统细菌学手册》、《原核生物》。

15.2 微生物鉴定

经典微生物学依赖于很多生化测试所得的信息来鉴定一个未知微生物的属和种。因为一般需要进行大量的生化测试，因此鉴定过程通常非常缓慢，且费用昂贵。然而，有经验的葡萄酒实验室实验人员通常将经典的鉴定步骤简单化，而采用快速但只是试验性的鉴定方法。

酒厂第一步采用的微生物测定方法是用显微镜观察微生物。先将葡萄汁或葡萄酒样品制备成湿片（见 12.5），用相差显微镜观察（见 12.2.3）。通过镜检，可以得到以下信息：细胞形状（球形、棒杆状、尖头状、保龄球状、蛋状、尖顶状、细长形、柠檬状、针状等），细胞大小（直径）以及细胞聚集状态（单个、成对、四联体、多聚体或链状）。比如，在酒精发酵初期，若镜检观察到体积较小呈柠檬形状的酵母，则证明有克勒克酵母或有孢汉逊酵母存在，而发现棒状细菌，则说明可能受乳杆菌属的污染。虽然采用显微镜可以快速检测，但是必须注意到镜检的观察领域必须很大，因为镜检对菌浓要求较高（见 14.4）。鉴于此，通常要求离心来浓缩细胞。葡萄酒微生物及其菌落的形态在显微镜下的照片可以详细参照 Edwards（2005）。

虽然镜检法很快捷，但是采用此法对酒的鉴定可能会产生错误的结果。首先，培养基差别以及生长周期不同会导致酵母形态迥异。比如，在麦芽糖琼脂上培养 72h 后的酵母形态可能会与刚从完全酒精发酵结束后得到的细胞具有明显的差异。其次，同种酵母大小和形状会变化很大，即使在纯培养时，酵母也会以出芽方式进行无性生殖。例如，细尖酵母克勒克酵母和有孢汉逊酵母的年轻子细胞在形态上几乎为球形，但在连续出芽后，衰老的母体细胞会变成明显的柠檬状。因为这种微生物在培养了一周后，球形和柠檬形的酵母可以同时被观察到，而这一观察结果会被误以为存在染菌。

如果要求鉴定菌种，在鉴定其特性之前，需要从葡萄酒中将微生物分离出来（见 13.9）。可能有必要进行数次划线分离来得到完全没有污染的纯培养物。除非微生物已被认为是某种特定属，否则就需要采用多种培养基将样品中的不同微生物分离出来。

观察琼脂上培养出的微生物时，如图 15.1 所示，记录菌落特征是非常重要的。菌落特征包括菌落形状（圆形、不规则、根须状）、菌落大小（直径，单位为 mm）、菌落形态（扁平、突出、隆起、凹陷、凸起）、菌落颜色、透明程度（透明、半透明、不透明）、菌落表面（光滑、粗糙、灰暗、明亮）、菌落边缘（平整状、波状、叶状、锯齿状、根须状）以及周围琼脂的变化（分别由 pH 或 CaCO_3 指示剂引起的颜色或透明程度的变化）。

一旦分离得到纯培养物，可以下一节所介绍的鉴定方法更好地对未知微生物进行分类描述。本章介绍的是葡萄汁或葡萄酒中酵母、霉菌（见 15.3）以及细菌（见 15.4）的经典分类、鉴定方法。

15.3 酵母与霉菌

酵母细胞形态随培养技术及生长周期中所处阶段的不同而不同，在鉴定中这一步骤必须标准化。理论上，将刚分离出的纯种菌落接入营养肉汤培养基中，

25℃下培养 72h，或直至菌落长出，然后镜检。一般而言，大多数酵母只需培养 2~4d，而纯种德克酵母/酒香酵母则需要培养更长时间（10~14d）。在琼脂培养基上培养时，与更小的（针尖状）透明的细菌菌落相比，典型的纯种酵母菌落更大，且不透明（奶油色）。另外，颜色变化（色素产生）可以提供快速判断的依据。比如，红酵母在实验培养基上菌落呈橙红色。



图 15.1 固体平板上微生物生长的不同形态

如前所述，是否具有子囊孢子对于鉴定也是重要的依据（见 1.2.1）。通常使用的产孢培养基，如表 15.1 所示。由于这些培养基也可用于常规的分离和培养，因此通常刚分离出的酵母也会观察到子囊孢子的形成。如在特定的分离物中观察到子囊孢子的形成，对孢子的特征描述也是具有鉴定价值的。这类特征还包括每个母细胞（子囊）的产孢子数，孢子表面形态（边缘、赤道环、瘤状）以及孢子颜色。如图 15.2 所示，子囊孢子的形态差异较大，可以是帽状、星状、针状或者球状。另外，母体细胞的物理外观以及子囊中孢子是否被释放出来或保留也非常重要。

表 15.1 酵母分离产孢推荐培养基

酵母	孢子培养基
德克酵母	琼脂培养基，富集酵母浸出物-麦汁培养基 ^b
有孢汉逊酵母	麦汁培养基 ^b ，番茄-葡萄糖培养基 ^b
汉逊酵母 ^a	酵母浸出物-麦汁培养基 ^b ，麦汁培养基 ^b ，V8 培养基
美极梅奇酵母	酵母浸出物-麦汁培养基 ^b ，麦汁培养基 ^b ，V8 培养基
毕赤酵母 ^a	V8 培养基，醋酸盐培养基，麦汁培养基 ^b ，琼脂培养基
酿酒酵母	醋酸盐琼脂培养基 ^b
路德类酵母	琼脂培养基，麦汁培养基 ^b
粟酒裂殖酵母	酵母浸出物-麦汁培养基 ^b ，麦汁培养基 ^b ，V8 培养基
德尔布有孢圆酵母	酵母浸出物-麦汁培养基 ^b
拜耳结合酵母	麦汁 ^b 培养基，酵母浸出物-麦汁培养基 ^b

a: 在以上各给定的培养基条件下，产孢与种相关。
b: 以上各培养基均可在实验室自主配制，购买商品化已配制好的培养基会使实验更加便捷。

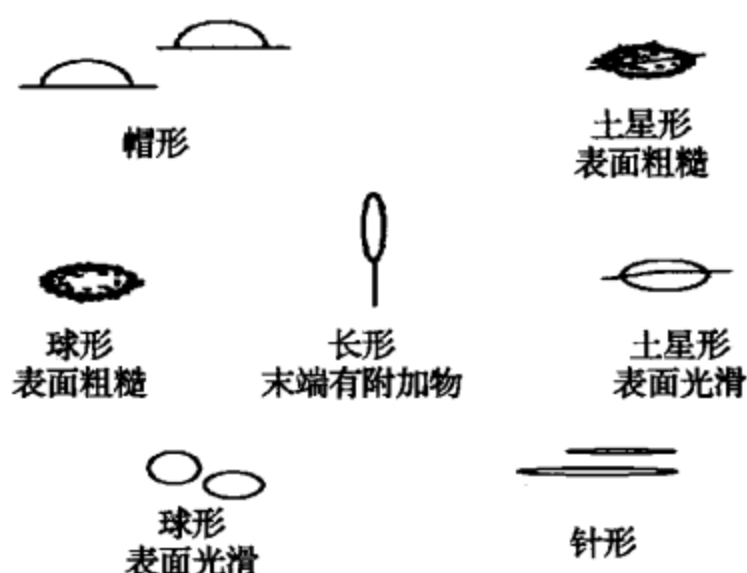


图 15.2 酵母子孢子的典型形态 [摘自 Yarrow (1998)]

15.3.1 碳、氮源的吸收利用

分离得到的纯种菌株能否在碳源或氮源的培养基中氧化利用（吸收）单一碳源或氮源，正被广泛应用于酵母和霉菌的鉴定。比如，可以通过将毕赤酵母与汉逊酵母生长在以硝酸盐为单一氮源的培养基上的能力，将两者区分开来 (Yarrow, 1998)。

只有年轻、生长茁壮的微生物才能用于测定碳氮源的利用情况。而且，测试前必须由酵母浸出物 - 麦汁培养基上转移而来，否则微生物还可能携带部分营养物质。为了降低这个影响因素，包括只含基本培养基和酵母（不含碳源或氮源）的合适控制方法也应用于这些分析中。

碳源化合物的利用实验使用不含碳源的 YNB (yeast nitrogen base)；氮源化合物的利用实验使用不含可利用氮源的 YCB (yeast carbon base)。该测试中使用的 YNB 不含任何氨基酸和硫酸铵 (Anonymous, 1984)。如 Yarrow (1998) 所述，通常测试的碳源包括戊糖、己糖、还原性双糖、三糖、多糖、醇、有机酸以及糖苷。通常测定的氮源包括硝酸盐、亚硝酸盐、乙胺乙酸盐、尸胺盐酸盐、L-赖氨酸、咪唑、氨基葡萄糖、肌酸和肌酐。当以硝酸盐作为测试物时，必须将培养基 pH 调节至 6.5，当 pH 低于 6.0 时，会生成有毒的亚硝酸。

可用培养液或倾倒平板培养目的微生物来测定碳氮利用谱。该技术的成功应用需要纯培养的霉菌，并保证碳氮源无污染。为了描述培养情况 (Anonymous, 1984)，可在管子后附一个带有精确格线的白色指示卡。记录模糊/浑浊度影响可视度的程度来判断菌的生长情况。相应的生长情况可如下打分：

通过菌雾或浑浊度来判断菌的生长情况。相应的生长情况打分如下：

- | | |
|---------------|-----------|
| 显示卡上观察不到格线 | (+ + +) |
| 显示卡上观察到微量格线 | (+ +) |
| 显示卡上观察到格线但不清晰 | (+) |

显示卡上观察到明显格线,且浊度未增加 (-)

与发酵液分析不同,生长谱测定是将微生物纯培养物接入一个富含各种碳源或氮源的培养基上进行培养作为对照。如果微生物能在利用碳源或氮源上生长,则会在碳源或氮源的周围观察到薄雾或者浑浊。

测定微生物生长谱中的一个困难就是琼脂表面多余的水汽会导致待测化合物的流动,从而导致污染。虽然有人推荐将培养皿放入37℃的烘箱90min烘干多余水汽,但是这样不仅会引起微生物污染,还会导致热敏感菌的热损伤或死亡。在这些情况下,在氮源利用分析实验中测定为“阳性”的结果还需进行再次验证,可以挑取一环培养基,接入与含有原培养基相同氮源的新鲜培养基中,培养一周后再次鉴定。

选择生长谱法还是营养液法来考察微生物对碳氮源的利用情况取决于个人的偏好性,一般,生长谱法操作更容易。

15.3.1.1 营养液法检测碳源利用情况

1. 配置10 × YNB母液:称取6.7g YNB(不含氨基酸、硫酸铵),溶于90mL蒸馏水中。溶解后定容至100mL,0.45μm的滤膜过滤除菌,置于冰箱中保存备用。

2. 酵母接种物的制备

- 在9mL蒸馏水中加入1mL 10 × YNB母液。
- 向培养基中加入10mg葡萄糖,50mg硫酸铵,10mg组氨酸,20mg蛋氨酸,20mg色氨酸,溶解后用0.45μm的滤膜过滤除菌。
- 接种单菌落,25℃培养48h。
- 接种前,用无菌水将培养液稀释至“微浑浊”。
- 从该培养基中反复转接微生物可以提高细胞适应能力和降低生物体内糖的贮存,以降低对结果的影响。

3. 在无菌状态下,取0.5mL 10 × YNB贮存液于灭菌的带塞或有棉花塞的16mm × 125mm试管中。

4. 用蒸馏水配置浓度为5g/L的一系列碳源(糖、糖醇和有机酸)溶液。棉籽糖需要配制10g/L的溶液,用0.45μm的滤膜过滤除菌。

5. 向含有0.5mL 10 × YNB溶液的试管中加入4.5mL上述配制的特定碳源溶液,过程保持无菌。空白为含有0.5mL 10 × YNB的贮存液和4.5mL无菌蒸馏水。

6. 用灭菌移液器取1~2滴酵母接种物,接入上述含所有碳源的试管中。

7. 将试管置于25℃培养1周。为了保证整个培养阶段的氧化条件,一些实验室选择倾斜放置试管,而非将试管垂直培养。

15.3.1.2 生长谱法检测碳源利用情况

1. 配制10 × YNB母液:称取6.7g YNB,溶于大约90mL蒸馏水中。溶解后定容至100mL,0.45μm的滤膜过滤除菌。

2. 酵母接种物的制备:

- a. 在 9mL 蒸馏水中加入 1mL 10 × YNB 母液。
- b. 向培养基中加入 10mg 葡萄糖, 50mg 硫酸铵, 10mg 组氨酸, 20mg 蛋氨酸, 20mg 色氨酸, 溶解后于 0.45 μ m 的滤膜过滤除菌。
- c. 接种单克隆, 25℃ 培养 48h。
- d. 从该培养基中反复转接微生物可以提高细胞适应能力和降低生物体内糖的贮存, 以降低对结果的影响。

3. 将 6.7g/L 的 YNB 和 20g/L 的琼脂混合, 采用沸水浴溶解。取 20mL 转入戴帽或带塞的 20mm × 150mm 试管中, 121℃ 灭菌 15min。

4. 灭菌后, 立刻放入 45 ~ 50℃ 的水浴锅中保温。

5. 取 0.1mL 酵母接种物于培养皿中央, 准备倾注平板。向培养皿中倾注合适温度的琼脂培养基, 运用“八字形”手势, 将酵母与培养基琼脂混合均匀。琼脂完全凝固并冷却前不要进行下一步操作。

6. 运用实验室里的记号笔, 将目的化合物名称写在培养皿底部。每个培养皿最多可以同时测试 3 种化合物。

7. 每种碳源化合物各取 5mg 于琼脂表面, 铺于离培养皿边缘 1 ~ 1.5cm 的区域。如果使用同一把药勺进行转移操作, 则操作完一种化合物后, 要将药勺彻底洗净、灭菌才可再用。一旦将化合物铺于琼脂表面, 保持培养基朝上。

8. 平板倒置, 25℃ 培养 3 ~ 7d 后再进行结果分析。

15.3.1.3 营养液法检测氮源利用情况

1. 配制 10 × YCB 母液: 称取 11.7g YCB, 溶于约 90mL 蒸馏水中。溶解后, 定容至 100mL, 0.45 μ m 的滤膜过滤除菌, 置于冰箱中备用。

2. 酵母接种物的制备。

- a. 在 9mL 蒸馏水中加入 1mL 10 × YNB 母液。
- b. 向培养基中加入 10mg 葡萄糖, 50mg 硫酸铵, 10mg 组氨酸, 20mg 蛋氨酸, 20mg 色氨酸, 溶解后于 0.45 μ m 的滤膜过滤除菌。
- c. 接种单克隆, 25℃ 培养 48h。
- d. 从该培养基中反复转接微生物可以提高细胞适应能力和降低生物体内糖的贮存, 以降低对结果的影响。

e. 接种前, 用无菌水将培养液稀释到“微浑浊”。

3. 在无菌状态下, 取 0.5mL 10 × YNB 贮存液于灭菌的带塞或有棉花塞的 16mm × 125mm 试管中。

4. 分别溶解 0.078g 硝酸钾 (KNO_3), 0.026g 亚硝酸钠 (NaNO_2), 0.064g 乙胺盐酸盐和 0.080g L-赖氨酸于 10mL 蒸馏水中, 0.45 μ m 的滤膜过滤除菌。

5. 向含有 0.5mL 10 × YCB 贮存液的试管中加入 4.5mL 特定氮源溶液, 过程保持无菌。空白为 0.5mL 10 × YCB 贮存液和 4.5mL 无菌蒸馏水。

6. 用灭菌移液管取1~2滴酵母接种物,接入所有试管中。

7. 将试管置于25℃培养1周。为了保证整个培养阶段的氧化条件,一些实验室选择倾斜放置试管,而非将试管垂直放置。

15.3.1.4 生长谱法检测氮源利用情况

1. 配制10×YCB母液:称取11.7g YCB,溶于约90mL蒸馏水中。溶解后,定容至100mL,0.45μm的滤膜过滤除菌。置于冰箱中保存备用。

2. 酵母接种物的制备:

a. 在9mL蒸馏水中加入1mL 10×YNB母液。

b. 向培养基中加入10mg葡萄糖,50mg硫酸铵,10mg组氨酸,20mg蛋氨酸,20mg色氨酸,溶解后于0.45μm的滤膜过滤除菌。

c. 接种单克隆,25℃培养48h。

d. 从该培养基中反复转接微生物可以提高细胞适应能力和降低生物体内糖的贮存,以降低对结果的影响。

3. 将11.7g/L的YCB和20g/L的琼脂混合,采用沸水浴溶解。取20mL转入带帽或带塞的20mm×150mm试管中,121℃灭菌15min。

4. 灭菌后,立刻放入45~50℃的水浴锅中保温。

5. 取0.1mL酵母接种物于培养皿中央,准备倾注平板。向培养皿中倾注合适温度的琼脂培养基,运用“八字形”手势,将酵母与培养基琼脂混合均匀。琼脂完全凝固并冷却前不要进行下一步操作。

6. 运用实验室里的记号笔,将目的化合物名称写在培养皿底部。每个培养皿最多可以同时测试3种化合物。

7. 每种碳源化合物各取5mg于琼脂表面,铺于离培养皿边缘1~1.5cm的区域。如果使用同一把药勺进行转移操作,则操作完一种化合物后,要将药勺彻底洗净、灭菌后才可再用。一旦将化合物铺于琼脂表面,保持培养基朝上。

8. 平板倒置,25℃培养3~7d后,分析生长圈。

15.3.2 子囊孢子的证明

分离酵母纯种细胞时,需要记录细胞形态、出芽方式和芽的大小。如果是刚分离得到的酵母菌可能正在产孢子,就不需进行下一步工作。否则,需要将纯种转移到表15.1中所述的培养基上,25℃培养2~3d后再分析结果,以后每周检测一次,共检测6周。结果检测时需要制备湿片(见12.5),采用相差显微镜进行观察。或者也可以用孔雀绿(见15.3.2.5)对湿片进行染色,然后用明视野显微镜进行观察。如果没有观察到孢子,将微生物接种到另外一种培养基上继续培养、连续观察6周。

Yarrow (1998) 描述了醋酸盐琼脂2培养基, Gorodkova 琼脂培养基和 V-8 培养基。van der Walt 和 van Kerken (1961) 最早描述了酵母膏-麦芽汁培养基

的应用。用孔雀绿对孢子微生物的染色过程如 Yarrow (1998) 所示。

15.3.2.1 醋酸盐琼脂 2 培养基

1. 将下列物质混合并溶解:

葡萄糖	1g
KCl	1.8g
三水醋酸钠	8.2g
酵母膏	2.5g
琼脂	15g
蒸馏水	900mL

2. 沸水水浴溶解各物质成分, 溶解后用蒸馏水定容至 1000mL。121℃ 灭菌 15min。

3. 灭菌结束后, 立刻放入 45 ~ 50℃ 的水浴锅中保温。

4. 倾注平板, 静置待琼脂完全凝固。

5. 将接种环于火焰上灼烧, 冷却后, 向培养基中接种新鲜的培养物 (培养时间为 24 ~ 48h), 25℃ 培养 2 ~ 3d 后, 镜检。

15.3.2.2 Gorodkova 琼脂培养基

1. 将下列物质混合并溶解:

葡萄糖	1g
NaCl	5g
蛋白胨	10g
琼脂	20g
蒸馏水	900mL

2. 沸水水浴溶解各物质成分, 溶解后用蒸馏水定容至 1000mL。121℃ 灭菌 15min。

3. 灭菌结束后, 立刻放入 45 ~ 50℃ 的水浴锅中保温。

4. 倾注平板, 静置待琼脂完全凝固。

5. 将接种环于火焰上灼烧, 冷却后, 向培养基中接种新鲜的培养物 (培养时间为 24 ~ 48h), 25℃ 培养 2 ~ 3d 后, 镜检。

15.3.2.3 V-8 琼脂培养基

1. 在 1000mL 三角瓶中, 将 5g 浓缩面包酵母悬浮于 10mL 蒸馏水, 加入 350mL Campbell's V-8 蔬菜汁 (Campbell Soup Company, Camden, NJ, USA)。

2. 用 50% NaOH 调节 pH 至 6.8, 于沸水浴中加热约 10min。若 pH 有变化, 重新调节至 6.8。

3. 向另一个三角瓶中加入 14g 琼脂与 340mL 蒸馏水, 加热溶解。

4. 将两个三角瓶中所配溶液混合, 蒸馏水定容至 1L。121℃ 灭菌 15min。

5. 灭菌结束后, 立刻放入 45 ~ 50℃ 的水浴锅中保温。

6. 倾注平板，静置待琼脂完全凝固。

7. 将接种环于火焰上灼烧，冷却后，向培养基中接种新鲜的培养物（培养时间为24~48h），25℃培养2~3d后，镜检。

15.3.2.4 酵母膏-麦芽汁琼脂培养基

1. 混合并溶解下列各化合物，配制10×维生素培养母液：

生物素	0.0010g
叶酸	0.0010g
泛酸钙	0.20g
肌醇	1.0g
烟酸	0.20g
对氨基苯甲酸	0.10g
盐酸吡哆醇	0.20g
核黄素	0.10g
硫胺素	0.5g
蒸馏水	400mL

2. 溶解后，用蒸馏水定容至500mL，0.45μm的滤膜过滤除菌，并保存于-15~10℃下备用，用前需稀释10倍。

3. 将1%（体积分数）的维生素培养母液加入新鲜灭菌并冷却的（50℃）酵母膏-麦芽汁培养基中，完全混匀。

4. 将接种环于火焰上灼烧，冷却后，向培养基中接种新鲜的培养物（培养时间24~48h），25℃培养2~3d后，镜检。

15.3.2.5 孢子染色

1. 将培养物热固定在载玻片上。

2. 用蒸馏水配制的5g/L孔雀绿、0.5g/L碱性品红的混合溶液浸润载玻片。

3. 将载玻片于火焰上烘烤1min，然后用流水完全洗去染色剂。载玻片风干后用明视野显微镜观察。

15.3.3 菌丝体/假菌丝体的鉴定

通过真菌的玻片培养可以看出霉菌是否有菌丝体或假菌丝体存在（见12.6）。但是显微镜观察要求从培养微生物的平板里取出玻片培养物。这样就增加了其他微生物污染的可能性。为了将污染程度降至最低，必须限制观察次数，只有开始的一次或二次的观察结果才有效。

1. 准备玻片培养。

2. 配制合适的琼脂培养基，一般为土豆-葡萄糖琼脂培养基或玉米琼脂培养基（Anonymous, 1984），灭菌后。倾倒入灭菌平板中，冷却。

3. 用灭菌后的小勺将琼脂切割成合适大小的小块放入试管，琼脂的大小要

可以被盖玻片覆盖。

4. 将小勺再次灭菌（浸于70%酒精溶液，火焰烧灼），小心地挖出一块琼脂块，将其转移至灭菌后（置于灭菌的培养皿中）的载玻片中央（这步操作时要格外小心）。

5. 用灭菌接种环，向琼脂块上接种一个酵母单菌落。小心用灭菌镊子取灭菌盖玻片覆盖接种的琼脂块，注意务必要将所有的琼脂覆盖完全。

6. 向培养皿里加入足够的灭菌水，保持皿中足够的湿度。

7. 25℃培养4~7d后，镜检。

15.3.4 糖类的发酵

酵母氧化利用碳、氮源氧化的能力与其利用糖类发酵的能力并不总是相关。因此，酵母的发酵特性又为鉴定酵母种属提供了进一步的信息。酵母发酵利用某特定糖的能力可通过用杜氏管收集的CO₂来测定，该管管口向下，置于液体培养基内部。一般测定的糖包括：葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、棉籽糖和海藻糖。有时也用到以下糖：菊糖、淀粉、蜜二糖、纤维素以及D-木糖。还可以通过商业化的糖类发酵性能检测试剂盒来进行测定（见15.4.4）。

1. 用蒸馏水配制5g/L酵母膏液体培养基。

2. 可以进行高温灭菌的糖（如葡萄糖和半乳糖），在酵母膏液体培养基中，配制成20g/L的溶液。取10mL分装于带塞的18mm×150mm试管中，并将杜氏管敞口伸入试管中。将试管塞微盖，121℃灭菌15min。

3. 由于许多糖不能用高温灭菌，在酵母膏液体培养基中，配制成20g/L的溶液后，分别用0.45μm的滤膜过滤除菌。对于棉籽糖，需要配制成40g/L的溶液，因为一些微生物不能完全利用该糖（Yarrow, 1998）。取10mL分装带塞的18mm×150mm试管，并将杜氏管敞口伸入试管中塞紧试管塞。接种前记录空气体积。

4. 向各个试管中接种酵母，至培养基微浑浊。25℃培养不超过1周，每隔2~3d检测其中气体的产生情况。

15.4 细菌

许多情况下，葡萄酒酿造微生物学家通过细胞形态可以初步推断葡萄酒细菌的属。由于细胞形态差异，显微镜鉴定需再辅助一些生理生化测试来证实这些细菌的鉴定（见2.2和3.2）。比如，乳酸菌可以通过革兰染色和糖发酵试验初步鉴定。事实上，酒球菌、片球菌和乳杆菌的传统经典分类方法都是糖发酵试验（Garvie, 1967a; 1986a; 1986b; Kandler 和 Weiss, 1986; Edwards 等, 1991; 1993; Edwards 和 Jensen, 1992）。

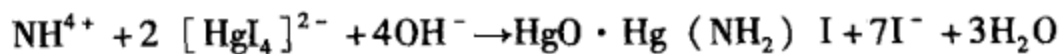
这些测试中存在的一个难题就是从葡萄醪或葡萄酒中分离得到的乳酸菌需要“番茄汁因子”(见2.3),这是一种存在于水果汁、蔬菜汁和果浆中的化合物。培养基中通常添加这些果汁或果浆来促进细菌生长。但是它们中又含有一些会影响糖发酵利用试验的糖。为了使细菌能在不含番茄汁因子的培养基中很好地生长, Garvie (1984) 表明额外加入泛酸或者加大接种量也可。除了添加果汁或果浆外, 通常还可以添加酵母膏 5g/L 作为氮源补充物, 再加入吐温-80 作为脂肪酸的来源 (Kunkee, 1974; Champagne 等, 1989)。

De Ley 等 (1984)、De Ley 和 Swings (1984) 和 Swings (1992) 发现以乙醇为碳源, 根据微生物利用乙醇的能力, 可以最快速地从葡糖杆菌中分辨出醋杆菌。醋杆菌将乙醇完全氧化成 CO_2 和 H_2O , 而葡糖杆菌只能将乙醇氧化成乙酸。换言之, 醋杆菌可以将乙酸氧化成 CO_2 和 H_2O , 而葡糖杆菌不能。De Ley 和 Swings (1984)、De Ley 等 (1984) 原先把葡糖酸醋杆菌划分为醋杆菌属, 因为两者利用营养物能力相似。醋化醋杆菌和巴氏醋杆菌可以通过考察其将甘油氧化成二羟丙酮的生酮作用来区分。醋酸菌经常会自发突变, 该行为给以表型特征为依据的鉴定带来困难 (Swings, 1992)。

15.4.1 精氨酸生成氨

用镜检法很难将酒球菌从乳杆菌属中分离出来, 因为它们的细胞形态很相似。这种情况下, Garvie (1984) 建议可利用精氨酸生氨作用来区分这两类微生物 (见2.4.2)。该方法利用异型发酵精氨酸培养基 (见13.6.3) (Pilone 等, 1991), 此培养基中不含果糖。

Nessler's 的反应试剂为碘化汞 (II 价), 将其溶解于碘化钾和氢氧化钾溶液中, 生成 K_2HgI_4 。该试剂可以用来检测氨的存在, 反应式如下:



若产生砖黄色则指示有氨存在。Nessler's 反应试剂 (CAS 7783-33-7) 已商品化, 实验室一般不需自行配制。

1. 将下列物质混合并溶解:

蛋白胨

5g

酵母膏

5g

K_2HPO_4

2g

葡萄糖

0.5g

蒸馏水

800mL

a. 溶解后, 定容至 1000mL。分装成 $2 \times 500\text{mL}$ 。

b. 向其中一份加入 1.5g 精氨酸·HCl。

c. 用 50% (体积分数) H_3PO_4 或 6mol/L KOH 将两份溶液 pH 调至 5.5。

d. 用 18mm \times 150mm 试管分装, 盖上试管塞。121℃ 灭菌 15min。

2. 制备基本培养基:

a. 将下列物质混合并溶解:

蛋白胨	10g
酵母膏	2.5g
吐温-80 [5% (质量分数) 溶液]	2mL
蒸馏水	800mL

b. 溶解后, 定容至 1000mL。用 50% (体积分数) H_3PO_4 或 6mol/L KOH 将 pH 调至 5.2。

c. 分装入瓶中, 121℃ 灭菌 15min。

3. 细菌接种物的制备:

a. 向 10mL 苹果汁 Rogosa 培养基 (见 13.6.1) 中接入一细菌单克隆, 培养 7d。

b. 离心收集菌体, 用尽量少的基本培养基重悬菌体。

c. 向各个试管中接入 0.1 ~ 0.2mL 培养的菌体, 向另一管中接入没有培养细菌的基本培养基作为空白。

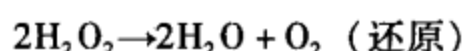
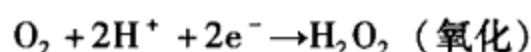
4. 氨的检测:

a. 培养 3 周后, 取 2mL 培养液离心 (含精氨酸、不含精氨酸的均取样)。

b. 每种培养液取 1mL 上清液放入一个白色瓷盘里, 加入 1 ~ 2 滴 Nessler's 试剂。

15.4.2 过氧化氢酶

过氧化氢 (H_2O_2) 是许多微生物菌株生长过程中的高反应活性的副产物。因为 H_2O_2 有毒, 因此这些微生物含有过氧化氢酶去除所生成的 H_2O_2 。



乳酸菌通常不含过氧化氢酶。因此, 乳酸菌处理过氧化氢的反应与上述所提的醋酸菌的产气作用不同。然而, 一些乳杆菌菌株含有假过氧化氢酶, 一旦接触到 H_2O_2 , 该酶就会发生阳性反应 (Edwards 等, 1993)。由于认为这种氧化还原作用很弱, 需要小心地盖上盖玻片, 然后置于立体显微镜中观察是否有气泡形成。而酿酒酵母能进行强烈的过氧化氢酶反应, 一般将其设为该反应的阳性对照。

Whittenbury (1964)、Pilone 和 Kunkee (1972) 最早阐述了该反应过程。30% H_2O_2 母液需要储存于 4℃, 但是随着时间推移, H_2O_2 还是会分解导致实验结果呈假阴性。因此, 进行该实验时 H_2O_2 溶液最好现配现用。

1. 将 0.15g 血红素置于 30mL 蒸馏水中, 加入 0.1mol/L NaOH 数滴至其溶解。

2. 溶液用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌，装于一预先灭菌的瓶中。
3. 配制 1000mL 苹果汁 Rogosa 琼脂培养基（见 13.6.1），但只向其中加入 5g/L 葡萄糖，调节 pH 至 5.5。
4. 将琼脂培养基灭菌，冷却至合适温度，向其中加入 10mL 血红素溶液后倾倒入平板，操作保持无菌。
5. 在固体琼脂平板上，将待测微生物划线。
6. 当琼脂上的单菌落长势良好（7~10d）时，向单菌落上滴入几滴新鲜配制的 3%（体积分数） H_2O_2 溶液。

15.4.3 葡聚糖与蔗糖

一些乳酸生产细菌有将蔗糖转化为多聚物即葡聚糖（黏度大，呈糊状）的能力。酒球菌中的多数菌株均没有该能力（Edwards 等，1991），而乳杆菌（Edwards 等，1993）和 *Leuconostoc mesenteroides*（Garvie，1984）的某些菌株具有该能力。Pilone 和 Kunkee（1972）最早阐述了判断微生物是否产生葡聚糖的方法：取一根灭菌接种针径直插入某单菌落中，再径直提起，若有丝状或线状黏物被接种针拉出，则证明有葡聚糖产生。

1. 配制 1000mL 苹果汁 Rogosa 琼脂培养基（见 13.6.1）。
2. 用 50%（体积分数） H_3PO_4 或 6mol/L KOH 溶液调节 pH4.5，加入琼脂（20g/L）， 121°C 灭菌 15min。灭菌后，将琼脂培养基置于 $45\sim50^\circ\text{C}$ 水浴中保温。
3. 向 100mL 蒸馏水中加入 50g 蔗糖，溶解。
4. 用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤蔗糖溶液除菌，并加入琼脂培养基中，操作保持无菌。
5. 倾倒入平板，每个平皿约 25mL 培养基。
6. 琼脂凝固后，将每个待测微生物划线于琼脂平板上， 25°C 培养 2 周后，用灭菌接种针测定是否有葡聚糖的产生。

15.4.4 糖类发酵

乳酸菌能发酵某些糖类产生酸和/或气体（ CO_2 ）的能力可以被用来鉴别乳酸菌。传统方法中，通过将微生物置于含多种糖类和 pH 指示剂的试管中发酵培养（Kandler 和 Weiss，1986）检测 pH，以确定微生物的发酵模式。常用于检测的糖类包括：扁桃苷、L-阿拉伯糖、熊果苷、D-纤维二糖、七叶苷、果糖、D-半乳糖、 β -龙胆二糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、松三糖、蜜二糖、 α -甲基-D-葡萄糖苷、棉籽糖、核糖、水杨苷、蔗糖、海藻糖、D-松二糖和 D-木糖。培养基颜色由蓝绿色变为黄色说明酸的存在（和细菌的生长），而起泡反应则说明气体（ CO_2 ）的生成。

近年来，一些操作方便简单的小型实验试剂盒问世。其中 API 系统方法用

于鉴定乳杆菌属，也可以用于鉴定其他乳酸菌。一种产品 bioMerieux (Marcy l'Etoile, France) 预装试剂盒中包含了一系列生化试剂，可以最大程度地提高鉴定未知微生物的效率。Pardo 等 (1988) 总结认为，该方法在鉴定酒球菌时得到的结论不够准确，而 Jensen 和 Edwards (1991) 成功地改进了培养基，使该方法可以用于葡萄酒中分离菌株。糖发酵测试中的阳性反应可以观察到明显的颜色变化 (比如，由蓝绿变为黄色)。有时候还能在矿物油下发现小气泡，这说明有气体产生。

进行上述测验时，一个重要的因素是特定的接种比例，而不是采用细菌直接平板检测 (见 14.5)，根据氯化钡 (BaCl_2) 浊度变化，用麦氏标准浊度可以判断菌体量。概括地说，在硫酸存在时， BaCl_2 的不同浓度与 BaCl_2 悬浊液中细菌数量显示出的浊度相关。用小试管 (见 15.2 节) 来制备 BaCl_2 悬浊液 (Gradwohl, 1948)，目测或用浊度测定仪 (见 14.7) 判断细菌数量。为大致测定培养液中的菌密度，可将硫酸和氯化钡溶解于用于悬浮细胞的同一灭菌的培养基中。

15.4.4.1 试管法

1. 取 10mL 在苹果汁 Rogosa 培养基中培养 7d 的培养液 (见 13.6)，离心，弃上清，用尽可能少的 1g/L 牛肉胨溶液重悬，向 18mm × 150mm 试管中接种 0.1mL。整个操作过程保持无菌。

2. 将下列物质混合并溶解：

蛋白胨	10g
酵母膏	5g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	5g
柠檬酸氢二铵	2g
醋酸钠 ($\text{NaC}_2\text{O}_2\text{H}_3$)	5g
硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5g
硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.2g
吐温 - 80	1.0g
蒸馏水	800mL

3. 各成分溶解后，定容至 900mL。加入氯酚红 (0.5g/L)，用 50% (体积分数) H_3PO_4 或 6mol/L KOH 调节 pH 至 6.2 ~ 6.4。

4. 加入 15g 琼脂，121℃ 灭菌 15min。

5. 取各待测糖 10g，溶解于 100mL 蒸馏水中，用 0.45μm 过滤膜过滤除菌，加入适温的培养基中。使用前确保糖全部溶解 (比如，七叶苷与水杨苷较其他糖相对难溶)。

6. 快速取上述试管中的 10mL 含糖培养基，加入含微生物的 18mm × 150mm 试管中。振荡摇匀后静置待琼脂凝固后，培养 7 ~ 10d。如果微生物生长不理想，可分别向培养基中加入 20g/L 的蛋白胨溶液和/或 0.2mg/L 泛酸钙溶液。

15.4.4.2 API 法

1. 取 10mL 苹果汁 Rogosa 培养中的细胞培养物（见 13.6）离心。
2. 弃上清，用尽可能少的含 10g/L 蛋白胨、2.5g/L 酵母膏、0.1g/L 吐温-80 与 0.2g/L 泛酸钙的基础培养基重悬，整个操作过程保持无菌。
3. 将细胞悬浮液加入上述基础培养基，其中包含 pH 指示剂（0.016% 溴甲酚绿），使吸光值达到麦氏标准浊度 2 的水平（表 15.2）。

表 15.2 麦氏标准浊度推测细菌数量

麦氏标准浊度	10g/L H ₂ SO ₄ 体积/mL	10g/L BaCl ₂ 体积/mL	推测细菌数目/ (×10 ⁶ CFU/mL)
1	9.9	0.1	300
2	9.8	0.2	600
3	9.7	0.3	900
4	9.6	0.4	1200
5	9.5	0.5	1500
6	9.4	0.6	1800
7	9.3	0.7	2100
8	9.2	0.8	2400
9	9.1	0.9	2700
10	9.0	1.0	3000

4. 将细菌悬浮液接种于 API 快速 CH 系统（API Analytab Products, Plainview, 纽约）的各个孔中。用无菌矿物油封住以保持无氧状态。
5. 将 API 槽置于 25℃ 培养 28d，按照每个生产菌的指示标准对每个孔打分。

15.4.4.3 麦氏标准浊度

1. 按表 15.2 将 10g/L 硫酸溶液和 10g/L BaCl₂ 溶液混合，配制麦氏标准浊度液。
2. 若是用 API 快速 CH 系统，最好将麦氏标准浊度 1~4 均进行实验，再比较培养的菌体浓度，以确定所需的最佳稀释度。

15.4.5 葡萄糖产气

发酵葡萄糖产生 CO₂ 是异型发酵菌（酒酒球菌和一些乳杆菌）的特点。相反地，不能发酵葡萄糖产生 CO₂ 为糖的同型发酵，表明是片球菌或一些乳杆菌。值得注意的是，某些乳杆菌属被划分为兼异型发酵，但以己糖（如葡萄糖）为原料时进行的是同型发酵，不产生气体（见 2.4.1）。

方法 A 起源于 Gibson 和 Abdel - Malek（1945）、Garvie（1984），后来被 Edwards 等（1991）改进。方法 B 源于 Pilone 等（1991）。是否产气由管内的琼脂是否上浮（方法 A）或由杜氏气体收集管中是否有气体（方法 B）来辨别。

如果使用方法 A，但过程中却无明显气体产生，有必要将试管超声处理，迫使气体聚集，产生明显气泡。

如果细菌生长状态不佳，可以加入 20%（体积分数）番茄汁。但是，番茄汁中存在的葡萄糖和另一些糖类会影响实验结果的分析。所以，每种方法都需设置以下三个对照管：

对照 1：培养基 + 无葡萄糖 + 无微生物

对照 2：培养基 + 葡萄糖 + 无微生物

对照 3：培养基 + 无葡萄糖 + 微生物

如果对照 1 或 2 中产酸或产气，则说明培养基中被微生物污染，也说明所有试管都被污染。对照 3 中产酸或产气说明用来配制的番茄汁中糖浓度过高，如是这样，可用 0.2g/L 泛酸钙代替番茄汁加入培养基。

15.4.5.1 方法 A

1. 购买商品化的番茄汁，其中仅包含汁液和盐分（不含防腐剂、非浓缩的），或者用新鲜番茄自主制备。将 250mL 番茄汁 $3000 \times g$ 离心 30min。将上清倒出，收集上清番茄浆汁。分成小份保存于 -20°C 备用。

2. 混合下列物质并溶解：

蛋白胨	5g
酵母膏	1.25g
吐温 -80（5% 溶液）	1mL
溴甲酚绿（1% 溶液）	2mL
番茄汁	50mL
蒸馏水	200mL

3. 用 50%（体积分数） H_3PO_4 溶液调节 pH 至 5.2。

4. 将培养基分成两份，每份 125mL。向一份中加入 1.25g 葡萄糖，搅拌使其溶解，使葡萄糖终浓度约为 5g/L，从而去除了番茄浆汁的影响。将培养基放入 $45 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 水浴中。

5. 将 2.5g 琼脂加入 250mL 蒸馏水中，在灭菌锅中 110°C 蒸汽加热 10min 使其溶解。

6. 向步骤 3 的每份培养基中倒入 125mL 融化的琼脂（添加/不添加葡萄糖）。

7. 用 $18\text{mm} \times 150\text{mm}$ 试管分装并塞上塞子， 121°C 灭菌 15min。

8. 制备琼脂覆盖层。

a. 将 5g 琼脂加入 250mL 蒸馏水中，在灭菌锅中 110°C 蒸汽加热 10min 使其溶解。

b. 向每个带有螺纹盖的 $16\text{mm} \times 125\text{mm}$ 试管中分装 5mL， 121°C 灭菌 15min。

9. 混合下列物质并溶解配制基本培养基：

蛋白胨	10g
酵母膏	2.5g
吐温-80 (5% 溶液)	2mL
蒸馏水	800mL

溶解后, 定容至 1000mL。用 50% (体积分数) H_3PO_4 调节 pH 至 5.2, 分装至 100mL 稀释瓶中, 121℃ 灭菌 15min。

10. 含细菌接种物的培养试管配制如下:

- 从平板中接种培养物至 10mL 苹果汁 Rogosa 培养基 (见 13.6.1)。
- 3000 × g 离心收集细胞, 用尽量少的基本培养基 (步骤 8) 重悬细胞。
- 用 110℃ 蒸汽加热 10min 溶解培养基 (步骤 6) 和琼脂覆盖层 (步骤 7), 置于 45 ~ 50℃ 水浴中保温。
- 试管中 (步骤 8b) 接种 0.1 ~ 0.15mL 培养物后, 振荡摇匀, 立即插入冰水中冰浴。
- 琼脂完全凝固后, 向其上覆盖琼脂层 (覆盖高度为 5cm), 于 25℃ 培养 2 ~ 3 周。

15.4.5.2 方法 B

- 制备异型发酵-精氨酸培养基 (HFA) (见 13.6.3)。
- 向灭菌的 16mm × 150mm 试管中分装 9mL HFA, 试管中预先倒置一杜氏管, 盖上试管盖子, 121℃ 灭菌 15min。
- 向试管中接入 0.1mL 新鲜培养的微生物, 于 22 ~ 30℃ 最多培养 3 周。
- 除使用杜氏管外, 还可以向 HFA 培养基中加入约 1cm 厚度熔融的石蜡凡士林液 (凡士林与石蜡按 1:6 混合), 方便观察气泡的产生。

15.4.6 革兰染色

革兰染色是鉴定细菌最常用的手段之一, 区分菌种的依据是细胞壁结构的差异。染色过程时, 先用蓝色的染料结晶紫将细胞染色, 再用一种溶剂 (脱色剂) 将一些或所有的染料脱去, 用红色的番红染料重新染色 (“复染”)。染色完毕后, 不加盖玻片, 向载玻片上滴一滴松柏油, 置于明视野显微镜下用油镜观察。根据细胞中结晶紫残留的程度和番红染色的情况, 会显示革兰阳性反应 (细胞呈紫色) 或革兰阴性反应 (细胞呈红色)。乳酸菌为革兰阳性菌, 而醋酸菌一般都为革兰阴性菌。衰老的细菌染色结果可能有变化。

尽管革兰染色剂可以自主配制 (Anonymous, 1984), 也可以购买商品化的革兰染色试剂盒, 一个试剂盒可使用上百次, 且价格合理。染色很麻烦, 且很容易污染到手或者衣服。为了避免这个问题, 可以向载玻片上夹一长柄木夹当作把手。或者准备染色架, 并将废液直接通往实验室的下水道。

革兰染色还可用于鉴定非葡萄酒酿造微生物 (Suslow 等, 1982)。向载玻片

上滴两滴 30g/L KOH, 用平头木质牙签从培养基中转移细菌, 并于 KOH 液滴上, 快速地圆周形搅动, 以洗下细胞, 整个操作过程保持无菌状态。5 ~ 8s 后, 上下移动牙签观察“拉丝”(或泥状)作用。如果在 15s 内出现黏度的增加和拉丝, 则待测菌为革兰阴性菌。革兰阳性菌无此反应。

1. 制片, 染色前一定要热固定(见 12.4)。使用的细菌培养物要处于相同的生长阶段(培养时间相同), 注意细胞层不要太厚。

2. 用结晶紫浸润菌层, 静置 1min。

3. 用冷自来水轻轻洗去多余结晶紫。

4. 用碘液浸润菌层, 静置 1min。

5. 用冷自来水轻轻洗去多余碘液。

6. 小心地向载玻片上滴入脱色液浸润菌层, 脱色至细胞颜色褪去(30 ~ 60s)。

7. 用冷自来水轻轻清洗载玻片。

8. 用番红复染 30 ~ 60s。

9. 用冷自来水轻轻洗去多余染料。

10. 擦去多余水, 风干制片。

15.4.7 生酮作用

生酮作用是指某些醋酸菌可以氧化甘油生成二羟丙酮的能力。这个作用可以用来区分葡萄酒中两种重要的醋杆菌, 即醋化醋杆菌和巴氏醋杆菌(Swing, 1992)。因为前者可以氧化甘油, 而后者不能。

因为二羟丙酮为一种还原性糖醇, 可以用测定还原糖的任何一种方法来检测二羟丙酮, 应用最广泛的为Clinitest® (Ough 和 Amerine, 1988; Zoecklein 等, 1995)。采用Clinitest® 反应, 如果有“亮蓝色”生成, 则表明待测菌为巴氏醋杆菌(甘油不能被氧化), 若呈现“淡橄榄绿色”, 则说明是醋化醋杆菌(甘油可以被氧化)。

1. 混合下列物质并溶解:

酵母膏

0.5g

甘油

2mL

蒸馏水

100mL

2. 取 10mL 上述溶液于 18mm × 150mm 试管中, 塞上试管塞, 121℃ 灭菌 15min。

3. 向每个试管中接种细菌(0.1mL 新鲜的培养物), 培养。

4. 菌体生长时, 可用二羟丙酮的存在来确定甘油的氧化作用。

15.4.8 葡萄糖生成乳酸

虽然乳酸的化学式相同, 但它存在两种形式, 它们对光的偏振旋转作用不同。

能让光向右旋的为D-乳酸,让光向左旋的为L-乳酸。虽然乳酸菌以L-苹果酸为原料产生L-乳酸,但是以糖为原料生成乳酸的形式却因菌种而异。以葡萄糖为原料,某些菌只产生D-乳酸,另一些只产生L-乳酸,还有一些同时产生D-乳酸和L-乳酸的外消旋体(以DL表示)。比如,以葡萄糖为原料时,酒球菌只产生D-乳酸(Garvie, 1986a),片球菌产生L-或D-乳酸(Garvie, 1986b),而乳杆菌根据种的不同,可产D-, L-或DL-乳酸(Kandler 和 Weiss, 1986)。

Pilone 和 Kunkee (1972)、Edwards 等 (1991) 描述了该现象。乳酸的形式(D-或L-)可以用商业化的试剂盒(如Boehringer Mannheim GMBH)确定。

1. 将0.5g肝脏提取物溶于50mL蒸馏水,溶解至少30min。将该悬浮液用Whatman 1号滤纸过滤。

2. 混合下列化合物并溶解:

胰化蛋白胨	10g
蛋白胨	2.5g
酵母膏	2.5g
吐温-80 [5% (质量分数) 溶液]	0.5mL
蒸馏水	450mL

3. 将肝脏提取物溶液加入培养基中,用50% (体积分数) H_3PO_4 或6mol/L KOH 调节pH为5.5。

4. 培养基分成两份,每份250mL,121℃灭菌15min。

5. 向其中一份中灭菌培养基中加入1mL预先用0.45μm膜过滤除菌的50g/L葡萄糖溶液。

6. 将培养基分装于18mm×150mm试管,每个试管装10mL培养基。

7. 对照与反应如下:

对照1: 培养基 (管A)

对照2: 培养基+葡萄糖 (管B)

对照3: 培养基+细菌 (管C)

反应: 培养基+细菌+葡萄糖 (管D)

8. 按以下方法配制浓乳酸菌接种物:

a. 接种至10mL苹果汁 Rogosa 培养基 (见13.6.1), 25℃培养7d。

b. 3000×g离心30min,弃上清,用10mL磷酸盐缓冲液(2.71g NaH_2PO_4 、

8.12g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于1000mL蒸馏水)重悬菌体。

c. 重新离心,弃去磷酸盐缓冲液,用1g/L蛋白胨溶液重悬菌体。

d. 向步骤6的试管中接种1mL上述培养物。向所有不含菌体的对照管中加入1mL 1g/L蛋白胨溶液。

9. 培养2周以上,检测葡萄糖生成的乳酸。

10. 计算: 乳酸异构体用商业化的试剂盒来确认酶对D-乳酸或L-乳酸的

特异性，再通过分光光度计检查。

$$D\text{-乳酸或}L\text{-乳酸的浓度} = [\text{管}D - (\text{管}A + \text{管}B)] - [\text{管}C - (\text{管}A + \text{管}B)]$$

管 A 和管 B 分别代表了不加和加葡萄糖的未接种培养基中存在的 D - 乳酸和 L - 乳酸。这些试管中产生的乳酸量从管 C 和管 D 中减去，得到实际乳酸产量（参照步骤 7）。若管 A 和管 B 中乳酸浓度很大，则表面体系被污染或该方法出现了其他问题。

15.4.9 苹果酸的利用（监测苹果酸 - 乳酸发酵）

如前所述（见 2.4.3），乳酸菌可以将 L - 苹果酸（不是 D - 苹果酸）代谢转化为 L - 乳酸，可以用纸层析来检测该转化过程。采用层析系统，根据流动相（溶剂）与固定相（纸）的相对亲和力差异，葡萄酒中的各种有机酸达到分离的目的。一般，该系统都是上行的方式来进行的（溶剂向上进入纸内）。下行色谱也可以采用，通过将玻璃盘悬挂在色谱室底部上方。

Kunkee（1968）的实验过程操作简单，价格便宜，而且溶液中还存在一个酸碱指示剂——溴甲酚绿，它在 pH3.8 ~ 5.4 范围内时显示由黄至蓝的颜色变化。如果存在上述酸类物质，在蓝色背景中会观察到黄色斑点。

在实验中通过酸的迁移距离来确定酸度种类（图 15.3）。从基线到溶剂前沿，一般是如下顺序：酒石酸、柠檬酸（如果存在）、苹果酸、乳酸、琥珀酸。目标产物移动的距离和展开剂前沿移动的距离之比为每个斑点的比移值 R_f 。用溶液 1 所测得的有机酸的 R_f 值见表 15.3。然而乳酸和琥珀酸会共层析，会导致苹果酸 - 乳酸发酵过程的错误解释。

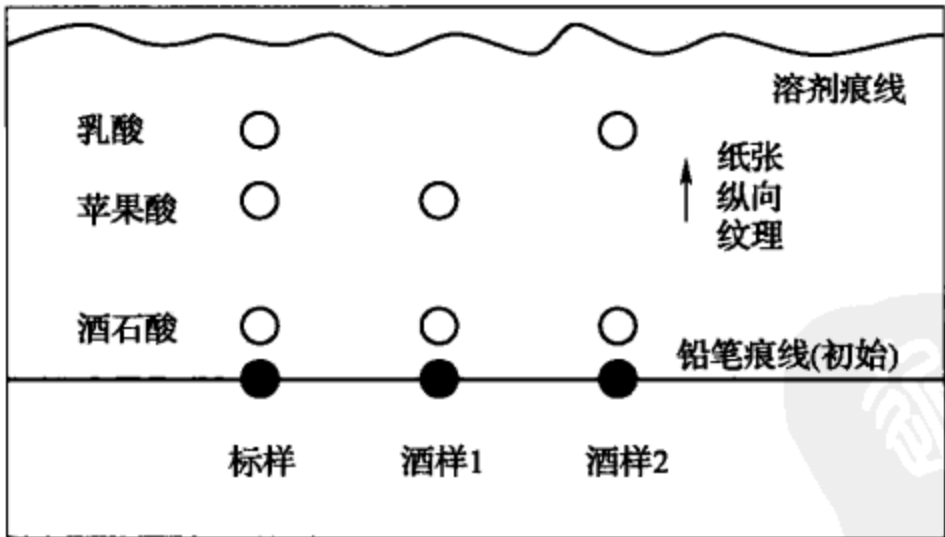


图 15.3 纸层析显示了酒样 1 和 2 及标准混合有机酸的纸层析分离情况
由于在该纸层析上苹果酸斑点的消失，因此可以推断
酒样 2 正在进行苹果酸 - 乳酸发酵

Kunkee（1968）发现陈旧的有机溶剂会吸收水分，这导致斑点拖尾或模糊。因为拖尾会给色谱结果分析带来困难，作者推荐每周制备新鲜的溶剂。不用时，用琥珀色试剂瓶封口存储，避免阳光直接照射。另外，接触层析纸的整个色谱

操作过程中都必须佩戴手套，以免手上存在的乳酸影响实验。

表 15.3 纸层析和溶剂 1 分离得到葡萄酒中各酸的 R_f

有机酸	R_f 值
酒石酸	0.28 ~ 0.30
柠檬酸	0.42 ~ 0.45
苹果酸	0.51 ~ 0.56
乳酸	0.69 ~ 0.78
琥珀酸	0.69 ~ 0.78

注：摘自 Kunkee (1968)。

该方法对苹果酸的检测限一般约为 100mg/L。没有出现苹果酸斑点不代表完成苹果酸-乳酸发酵（见 11.3.4）。相反，乳酸斑点的出现也不证明正在进行苹果酸-乳酸发酵，因为该类细菌可以代谢糖生成酸（见 2.4.1）。为了证明完成了苹果酸-乳酸发酵，有必要用酶法或高效液相色谱技术进行额外的苹果酸分析（Ough 和 Amerine, 1988; Zoecklein 等, 1995）。此外，Cartesio 和 Campos (1988) 将纸层析方法改进，使苹果酸的检出限降低到 30mg/L。

1. 配制溶液 1 或溶液 2。在通风橱中配制溶液，不要吸入所配溶剂。接触溶剂时戴上抗化学腐蚀的手套和口罩。

a 溶液 1：将 100mL n -丁醇，100mL 蒸馏水，10.7mL 贮存甲酸溶液，15mL 溴甲酚绿（0.1g 水溶性的溴甲酚绿钠盐溶解于 100mL 蒸馏水中）的混合液在分液漏斗中振荡混匀，偶尔转动活栓放气。将分液漏斗竖直静置，分层后，弃去下层水相。再用过滤纸将溶剂过滤，去除其中少量水。

b 溶液 2：将 125mL n -戊醇（1-戊醇），25mL 甲酸，0.125g 溴酚蓝和 100mL 蒸馏水混合在分液漏斗中振荡混匀，偶尔转动活栓放气。将分液漏斗竖直静置，分层后，弃去下层水相。再用过滤纸将溶剂过滤，去除其中少量水。

2. 采用上行色谱法时，向玻璃槽或玻璃缸中倾注足够多的溶剂，约 1cm 深。

3. 佩戴一次性手套，将纸层析纸裁成约 20cm × 35cm 规格的纸片。注意层析纸的“纹理方向”，使层析液沿着纹理方向进行移动。可以从层析纸的外包装盒上获得该信息，也可以向分析实验室或设备处购买预先剪裁好的层析纸。

4. 沿层析纸的长边用铅笔画一条淡线，该线距离底部边缘 2 ~ 2.5cm。有机酸标准品和葡萄酒样将沿着该线（基线）点样。

5. 用微量移液器取 10 μ L 标准有机酸溶液（10g/L 苹果酸、乳酸和酒石酸的混合溶液），点于同一斑点上。避免将所有 10 μ L 溶液一次性点上，因为形成的斑点直径应尽量小（<1cm）。可用吹风机将层析纸快速吹干。

6. 按照标准溶液的点样方法，每个酒样取 10 μ L 点样。每次用新的毛细管，两个斑点之间的距离为 2 ~ 2.5cm。

7. 等斑点干透后，再将层析纸转移到玻璃槽或缸中。为了能在玻璃缸中进

行层析, 将层析纸沿宽边卷成一个纸管, 在末端固定, 放进玻璃缸中。不能将基线没入层析溶剂中, 否则会影响层析, 并污染层析溶剂。

8. 层析 6 ~ 12h, 至溶剂线接近层析纸顶部。

9. 层析完成后 (如溶剂线接近但是没有到达层析纸顶部), 将层析纸取出层析槽, 挂在通风橱中风干。佩戴一次性抗化学腐蚀的手套, 防止手将层析纸污染。

15.4.10 果糖生成甘露醇

一些乳酸菌 (见 2.4.4) 可以产生甘露醇, 反应如下:



在富含果糖的培养基 (Pilone 等, 1991) 上, 利用细菌的生长可检测形成的甘露醇。在干燥的培养基中, 不需进一步放大观察, 肉眼就可以直接观察到形成的“大晶簇”般的甘露醇无机盐结晶。在 37℃ 环境下将水完全蒸发, 再置于 25℃ 环境中静置几天待结晶产生。通常水分完全干燥之前, 观察不到结晶形成。

1. 配制异型发酵 - 精氨酸培养基 (见 13.6.3)。

2. 取 9mL HFA 培养基置于 18mm × 150mm 试管中, 121℃ 灭菌 15min。

3. 从苹果汁 Rogosa 培养基培养的新鲜培养物中, 取 0.1mL 接种至试管中。

4. 于 22 ~ 30℃ 培养 3 周。

5. 培养结束后, 向 90mm 塑料培养皿中倾倒大约 8mL 培养液。

6. 于 37℃ 放置 2 ~ 3d, 静置干燥培养基。再置于 25℃ 培养 2 ~ 3d, 检测结果。

15.4.11 乙醇的氧化

根据氧化乙醇的能力不同可以区分醋杆菌和葡糖杆菌。醋杆菌可以将乙醇氧化成乙酸, 再转化为 CO₂ 和 H₂O。相反, 对葡糖杆菌, 乙酸就是其终产物。基于此特性, Carr 培养基和 Frateur's 培养基是分辨这两类细菌的常用培养基。下面要提到的碳酸钙 - 乙醇培养基 (CCE), 在组成上和 Frateur's 培养基非常相似。

Carr 培养基 (Swings, 1992) 中包括一个 pH 指示剂, 用来检测产酸菌。溴甲酚绿是酸碱指示剂, 当加入培养基中时, 可以检测酸性 (黄色) 和中性/碱性条件 (蓝绿色)。由于醋杆菌和葡糖杆菌都能将乙醇氧化成乙酸, 因此它们的培养基均会呈现由蓝绿色到黄色的变化。但是, 葡糖杆菌不能将乙酸氧化成 CO₂ 和 H₂O。因此, 葡糖杆菌的培养基随培养时间的延长, 仍保持黄色。而醋杆菌可以将乙酸代谢氧化成 CO₂ 和 H₂O, 因此延长培养时间, 培养基的颜色慢慢从黄色又变回原先的蓝绿色。

使用 Frateur's 或 CCE 培养基, 细菌产生的酸会中和不溶性 CaCO₃, 导致菌

落周围出现“透明”带或透明“圈”。这两个培养基的差别仅在于酵母膏和乙醇的浓度不同，酵母膏（Frateur's 10g/L，而 CCE 5g/L），乙醇 [Frateur's 2%（体积分数），而 CCE 3%（体积分数）]。

醋杆菌和葡糖杆菌都可以将乙醇氧化成乙酸，生成的酸使 CaCO_3 被中和，培养基中形成清晰的透明圈（更透明）。醋杆菌能将乙酸再次氧化成 CO_2 和 H_2O ，继续培养，之前形成的“透明”圈会重新变得不透明。而葡糖杆菌不能将乙酸再次氧化成 CO_2 和 H_2O ，透明圈不会再浑浊。

要检测到乙醇到 CO_2 和 H_2O 的氧化过程需要培养至少 3 周。随着培养时间的增长，需在平皿周围保持很高的湿度，以防止培养基干燥失水。

15.4.11.1 Carr 培养基

1. 将下列化合物混合并溶解：

酵母膏	30g
溴甲酚绿	0.022g
琼脂	20g
蒸馏水	800mL

2. 溶解后，用蒸馏水定容至 1000mL。用 50%（体积分数） H_3PO_4 或 6mol/L KOH 将 pH 调至 5.5，121℃/灭菌 15min。

3. 将含培养基的容器置于 50℃ 的水浴保温。温度平衡稳定后，向培养基中加入高浓度的酒精溶液或葡萄蒸馏酒（NSFG），使乙醇终浓度为 2%（体积分数）。

4. 培养基混匀，每个平板倾注 25mL 培养基。

5. 琼脂凝固后，细菌培养物划线，培养至出现单菌落。

15.4.11.2 碳酸钙 - 乙醇培养基

1. 将下列化合物混合并溶解：

酵母膏	5g
CaCO_3	20g
蒸馏水	800mL
琼脂	20g

2. 溶解后，用蒸馏水定容至 1000mL。

3. 121℃ 灭菌 15min 后，将培养基置于 45 ~ 50℃ 水浴中保温。温度平衡稳定后，向培养基中加入高浓度的酒精溶液或葡萄蒸馏酒（NSFG）使乙醇终浓度为 3%（体积分数）。

4. 完全混匀，每个平板倾注 25mL 培养基。因为 CaCO_3 容易沉淀，因此在倾倒大量培养基时需不断振荡培养基。

5. 琼脂凝固后，细菌培养物划线，培养至出现单菌落。

15.4.12 乳酸的氧化

醋杆菌的另一个显著特性就是可以将 D - 和 L - 乳酸氧化成 CO_2 和 H_2O 。

该反应可向培养基中加入醋酸钙，同时作为碳源和指示剂。醋杆菌可以利用乳酸生长，然后进一步将其氧化成为 CO_2 和 H_2O ，并生成硫酸钙沉淀。葡萄糖杆菌几乎不能在该培养基上生长，也不能氧化足够的乳酸来提高 pH，形成碳酸钙沉淀。

1. 将下列化合物混合并溶解：

酵母膏	20g
乳酸钙	20g
蒸馏水	800mL
琼脂	15g

2. 溶解后，用蒸馏水定容至 1000mL。用 50%（体积分数） H_3PO_4 或 6mol/L KOH 将 pH 调至 4.5。

3. 121℃ 灭菌 15min 后，将培养基置于 45 ~ 50℃ 水浴中保温。温度平衡稳定后，向培养基中加入高浓度的酒精溶液或葡萄蒸馏酒（NSFG）使乙醇终浓度为 3%（体积分数）。

4. 培养基混匀，每个平板倾注 25mL 培养基。

5. 琼脂凝固后，细菌培养物划线，培养至出现单菌落。



第 16 章 其他鉴定与计数方法

16.1 引言

上文介绍的表型检测方法是传统鉴定和计数细菌、酵母的基本方法。这些方法包括鉴定微生物的基本生化特点，如不同种类碳氮源的利用，特定代谢物的合成，或者是否存在某些生化途径。但是，上述方法大多需要很长的时间来培养微生物，可能需几天甚至数周才能得到结果。因此，由于时间的限制，对于酿酒师而言，这些信息价值很小或彻底失去意义。显然，及早发现腐败微生物可以将其繁殖的危险性降到最小，从而改善葡萄酒的质量。

过去的 20 年中，分子生物学和基因水平上的研究使更多更好的检测方法问世。和传统方法相比，它们检测时需要的微生物浓度更少，所需时间也更短 (Loureiro 和 Querol, 1999; Sancho 等, 2000)。用表型鉴定要求微生物必须是活的，而基因（分子）水平上的检测则没有这个要求。

下文介绍了很多种快速鉴定的方法。它们各有优缺点，例如在结果分析方面，而且这些方法都需要特殊的仪器和训练有素的操作人员。然而，随着这些技术的进一步发展，商品化的试剂盒已经问世，甚至已经可以在实验室外进行检测。

16.2 表型鉴定

表型鉴定包括物理和生理特性，可以将微生物同其他相关的微生物区分开。除了在 15 章中介绍的方法外，本章还将介绍几种其他可以用于葡萄和葡萄酒酿造微生物的鉴定方法。

16.2.1 Biolog 系统

Biolog 系统是 Biolog 公司 (Hayward, CA) 的产品，通过对碳水化合物、氮源、维生素和其他底物的氧化或利用情况，来确定微生物的表型 (Praphailong 等, 1997)。接种后，通过手动检测或利用微孔板阅读仪检测，来评价每个含有特定底物的孔中微生物的生长情况，再与数据库信息比对鉴定。尽管 Praphailong

等 (1997) 利用该系统鉴定酿酒酵母、德巴利酵母、汉逊德巴利酵母、柠檬型克氏酵母、*Dekkera bruxellensis* 和粟酒裂殖酵母, 但有实验者报道, 对 *Zygosaccharomyces bailii*、*Z. rouxii* 和 *Pichia membranifaciens* 检测结果的正确性较差。

16.2.2 脂肪酸甲酯分析

细胞壁和细胞膜上脂肪酸谱 (FAME) 的检测也用于微生物的鉴定 (Tredoux 等, 1987; Malfeito - Ferreira 等, 1989; 1997; Decallonne 等, 1991; Augustyn 等, 1992; Botha 和 Kock, 1993)。提取脂肪酸后, 衍生化为脂肪酸甲酯, 再用气相色谱分离定量, 所得数据再与数据库进行比对 (Suzuki, 1993)。FAME 方法被成功地应用于测定酵母中的脂肪酸 (Bendova 等, 1991; Rozes 等, 1992; Sancho 等, 2000)。

微生物生长条件的变化会影响脂肪酸的合成, 所以生长培养基的配方以及培养时间、培养温度一般要受控制 (Loureiro 和 Querol, 1999)。鉴定未知微生物时, 需要将结果 (如脂肪酸的类型和数量) 与数据库进行比对。因此, 由于培养条件的改变导致的非典型性的脂肪酸的合成, 会限制该方法的应用。相反, Loureiro (2000) 报道, 对于获得重复性结果, 培养基组成并不是关键影响因素。

16.2.3 蛋白质特性

不论是持续合成的蛋白质 (组成蛋白质), 还是某种环境因素诱导产生的蛋白质 (诱导蛋白质), 都是基因表达的特别产物。因此, 蛋白质被认为是核酸片段 (基因) 的 “指纹”, 基因编码蛋白质, 通过蛋白质序列可以反推得到基因序列。

将蛋白质从细胞中提取出来后, 可以通过一维或二维的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 来分离。这里, 蛋白质提取物是用半固体支持物 (凝胶) 实现, 根据它们在电场中特定泳道里迁移速度的不同达到分离效果。分离后不同泳道中代表不同蛋白质的条带可被染色而被观察到。不同蛋白质的存在与否就可以用于鉴定微生物的相似性或差异性。这种方法可以用于鉴定从葡萄酒中分离出的乳酸菌 (Couto 和 Hogg, 1994; Patarata 等, 1994)。

除了凝胶电泳外, 还可以用基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (MALDI - TOF - MS) 鉴定蛋白质。Karas 等于 1987 年发明该方法, 用一束激光激发完整的细胞, 使其表面的蛋白质离子化, 然后鉴定。不同的微生物蛋白质的离子化情况不相同, 可据此鉴定微生物。该方法的优点是只需要微量的样品和试剂, 并可快速获得结果, 但是昂贵的仪器费用对于酒厂来说是不现实的。

16.2.4 同工酶 (酶谱) 的电泳特点

同工酶是指催化相同的生化反应但是分子大小有差异的一类酶。比如, 将丙酮酸转化成乳酸 (见 2.4.1) 的乳酸脱氢酶 (LDH) 的电泳迁移率差异, 就

可以用来区分特定的乳杆菌 (Hensel 等, 1977)。比如, 葡萄酒中存在两种乳酸菌——布氏乳杆菌和短乳杆菌, 两者的生理生化特征非常相似, 它们之间最大的差别是, 前者可以发酵松三糖, 而后者不可以 (Kandler 和 Weiss, 1986)。但是 Kandler 和 Weiss (1986) 报道, 通过 LDH 的电泳迁移率鉴定的一株短乳杆菌可以发酵松三糖。Dicks 和 Van Vuuren (1988) 研究另一株 *L. brevis* 时也发现了这个现象。因此, Kandler 和 Weiss (1986) 得出结论, 用 LDH 的相对迁移率来区分这两种微生物是一种更加准确的方法。该方法还可以用来快速鉴定酿酒酵母的种和属 (Duarte 等, 1999)。

和其他分子水平的方法相比, 同工酶谱法施行起来相对便宜 (Loureiro 和 Querol, 1999)。同工酶检测需要选取不同生长阶段的酶进行检测, 因为微生物可能在不同的时间表达需检测的蛋白质。

16.3 免疫化学法

与抗原接触时, 微生物或活组织会产生抗体。免疫方法就是通过抗原和与抗体之间的特异性反应实现的。抗原可能是细胞壁或者荚膜、细胞的特殊结构, 或者是特殊的代谢产物。

16.3.1 酶联免疫分析

所有方法中, 酶联免疫分析 (ELISA) 已经运用了不少年。该方法在 20 世纪 70 年代早期首先被用于医学和兽医领域, 用于克服培养和鉴定病原体所需时间过长的缺点 (Crowther, 1995)。现代的单克隆抗体系统提供了更高的特异性 (Dewey 等, 2000), 从此 ELISA 被运用到更广泛的领域, 可用于检测、鉴定和定量低浓度的微生物。因为这个方法只需要抗原, 因此无法区别细胞的死活。

酶联免疫吸附利用了样品中复杂的 (夹心型) 抗体与抗原 (微生物) 之间的高特异反应。当完成最初的抗原-抗体结合后, 加入连有发色基团的二抗, 会产生颜色变化。也可以加入二抗上带有的酶的特异性底物, 生成不同颜色的产物 (见图 16.1)。修饰过的生色基团产生的颜色与最初抗原的浓度 (效价) 成正比。可以直接观察或用比色计测定颜色变化。

这些方法被衍生应用于葡萄酒工业的检测, 包括腐败酵母-酒香酵母 (Kuniyuki 等, 1984) 和即将成熟的葡萄上存在的葡萄孢霉的鉴定、计数 (Ravji 等, 1988; Marois 等, 1993; Dewey 等, 2005)。最新的研究已经将酶联免疫吸附的时间缩短到了几分钟 (Dewey 等, 2005)。如此短的反应时间和较好的灵敏度使这些方法可以运用于葡萄酒检测中。Kuniyuki 等 (1984) 在研究酒香酵母时, 检测限为 34 个细胞/mL, 与其他葡萄酒酿造微生物不会出现交叉反应。而且, 只要 24h 就可以得到反应结果, 而琼脂培养法需要一周或一周多的时间 (见 13.5)。

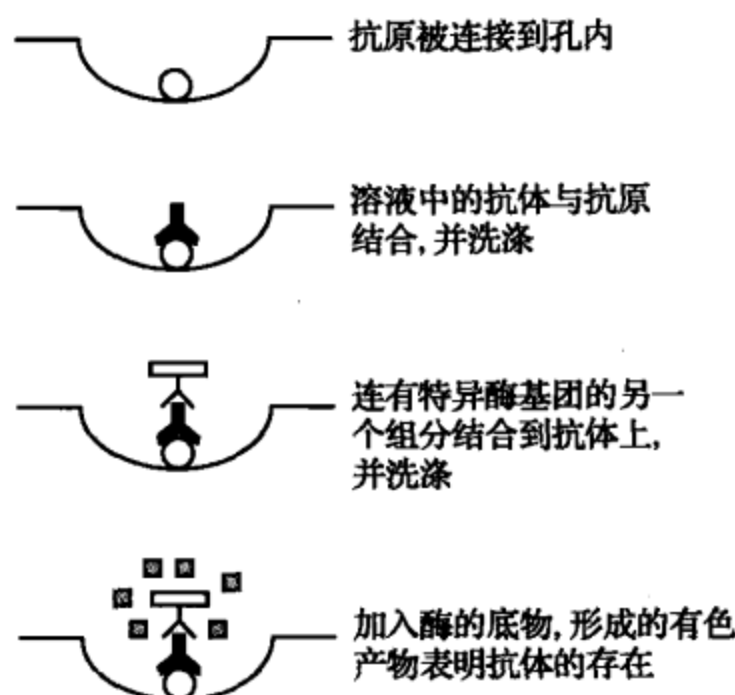


图 16.1 ELISA 的典型流程

16.3.2 免疫荧光显微镜

应用 ELISA 的方法, 抗体与细胞壁或细胞膜中的抗原特异反应, 第二抗原或特异抗体上的荧光基团发出的荧光就能被观察到。运用这些方法需要得到能与目的微生物发生特异抗原反应的特异性抗体。另外, 抗体和抗原反应的高特异性需要排除抗体与同一种中相近菌株产生免疫反应 (Atlas 和 Bartha, 1981)。荧光显微镜 (见 12.2.4) 应用时也要注意同样的问题。

16.4 系统分析

已经发展了很多以遗传物质 (DNA 或 RNA) 的异同为基础来鉴定微生物的方法。简言之, DNA 由互补双链 (或者序列) 构成, 互相缠绕形成“双螺旋”。侧链由核糖和磷酸基团交替排列构成 (见图 16.2)。两条链之间形成的共价键为 DNA 分子提供了高度稳定性。双螺旋结构内部由含氮化合物嘌呤 (腺嘌呤和鸟嘌呤) 和嘧啶 (胸腺嘧啶和胞嘧啶) 构成, 它们之间形成一系列氢键 (见图 16.3), 稳定了整个 DNA 分子。

DNA 双螺旋的生理结构为: DNA 两条链实行碱基严格配对, 嘌呤必须与嘧啶配对。腺嘌呤与胸腺嘧啶配对, 鸟嘌呤与胞嘧啶配对 (见图 16.3)。由于碱基严格配对, 由一条 DNA 链的碱基可以“读”出其互补链的碱基序列。每条 DNA 链的碱基序列都是特异性的, 因此它们可以作为微生物的“指纹”。

鉴定 DNA 中特定的碱基序列 (从 <100 个核苷酸到几千个核苷酸) 是鉴定微生物的高特异性方法 (Nadal 等, 1996)。另外, 这种方法可直接从基因水平进行比较, 不再需要二级产物的检测 (如蛋白质、代谢物), 而蛋白质等二级产物的产生会受细胞生理状态的影响。

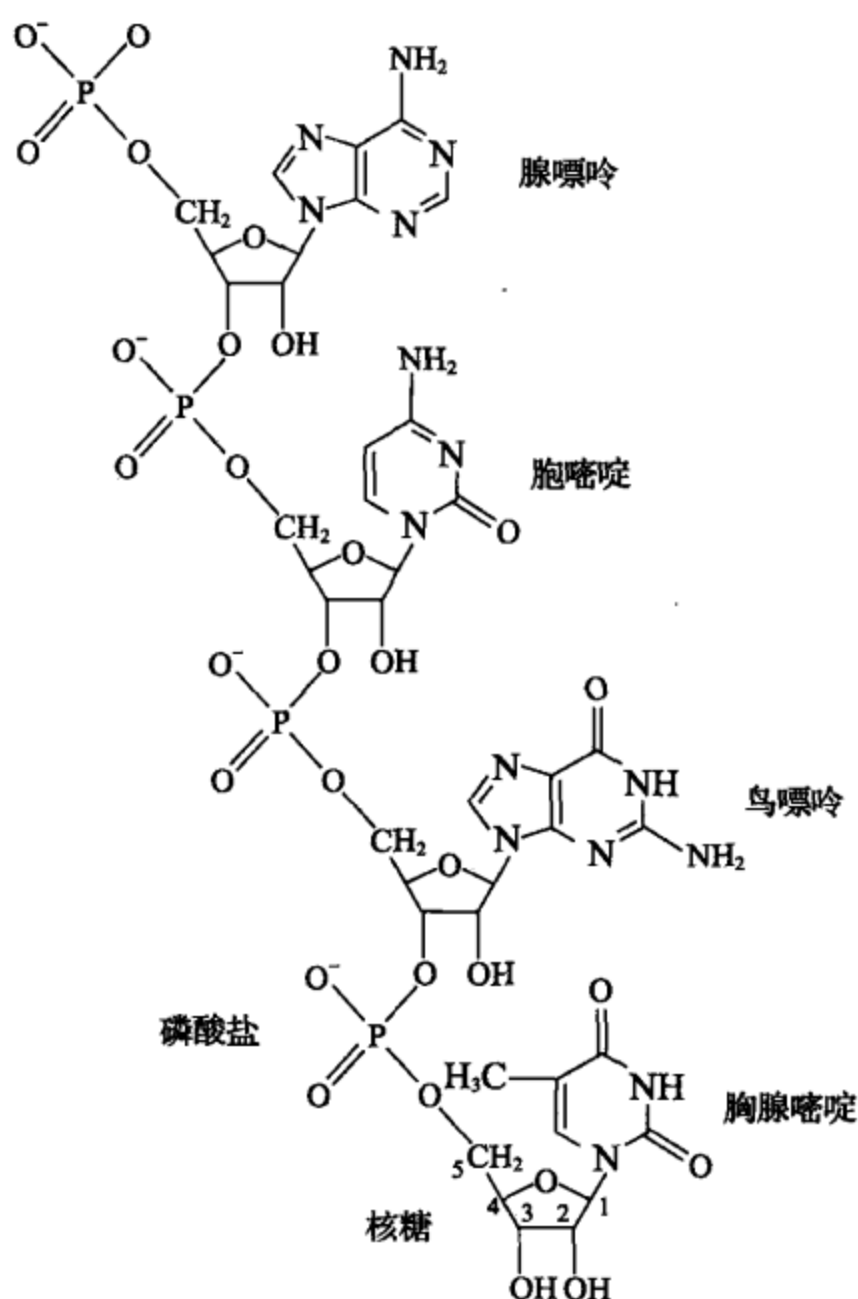


图 16.2 典型多聚核苷酸中磷酸和每个核苷酸（腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶）和核糖间的共价键示意图（核糖核酸 C-2 位上脱氧即得到脱氧核糖核酸）

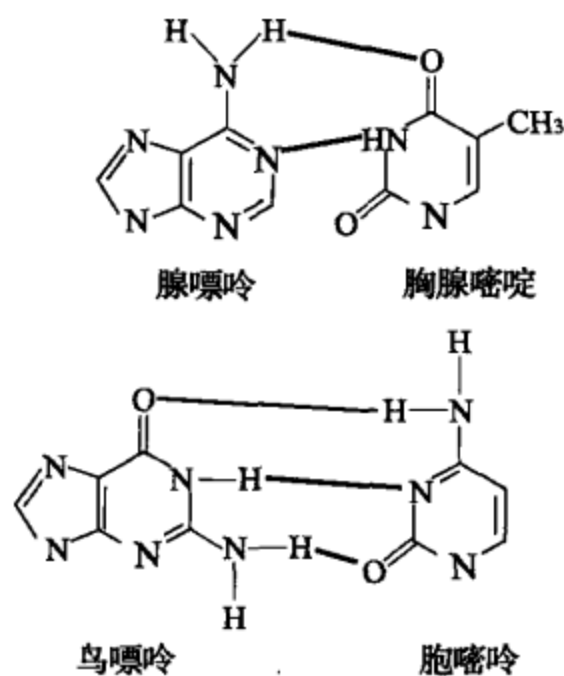


图 16.3 相邻多聚核苷酸之间腺嘌呤和胸腺嘧啶以及鸟嘌呤和胞嘧啶形成的氢键示意图

很多方法被应用于直接比较细胞自身基因组的异同性（Loureiro, 2000; Deak, 2002; Capece 等, 2003）。将分离出的 DNA 用核酸内切酶处理，酶在其

特异性位点将 DNA 分子切开。通过聚合酶链式反应 (PCR)，扩增酶切产物中的特异或随机选取的区域，再电泳分离 PCR 产物，再与其他分离的微生物或在数据库中进行比较。

16.4.1 聚合酶链式反应

正如其名，为了微生物的分离和鉴定，聚合酶链式反应 (PCR) 是一种扩增目的核苷酸片段 (特征长度 150 ~ 3000bp) 的方法。自从 1990 年 Mullis 开创性的实验起，PCR 就变成了分子生物学实验室中应用最广泛和最基础的工具之一。Lavallée 等 (1994)，Bartowsky 和 Henschke (1999)，Gindreau 等 (2001) 和 Deak (2002) 将该方法运用到了葡萄酒生物学中。

PCR 包括以下 3 个步骤：(a) 解链；(b) 退火 (引物与模板链结合)；(c) 聚合酶催化互补链的复制 (见图 16.4)。将 PCR 体系加热至 90 ~ 96℃，促使 DNA 解链。引物与双链中某一条上的特异性区域互补结合。从引物开始，聚合酶将扩增互补链。但是，因为该过程需要不断重复升降温度，极易导致酶的失活，因此需要在高温中能保持稳定的聚合酶，所以，选择 Taq DNA 聚合酶。它是从一株热稳定性的 *Thermus aquaticus* 中分离出的，在变性升温阶段该酶酶活性不受限制。反应产物是两条新 DNA 链，分别由模板链中的一条与对应互补的新合成的链组成。

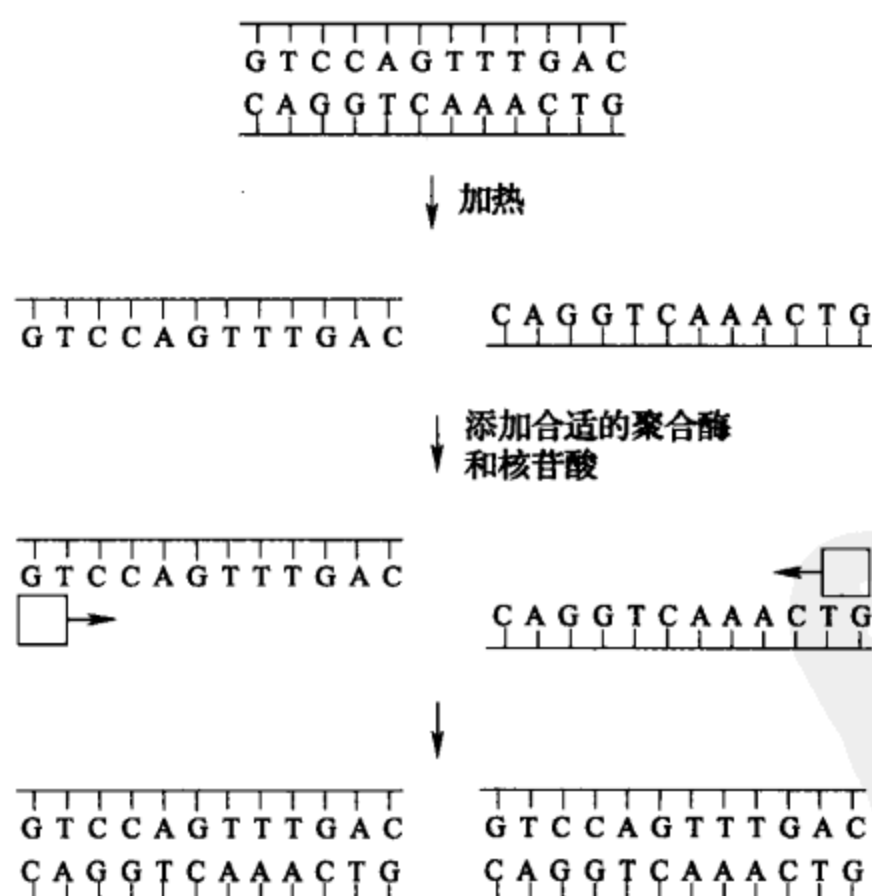


图 16.4 PCR 反应中靶核苷酸的扩增循环

因为每条新合成的链都可以进行自主复制，因此每个循环后，DNA 链数目都会翻倍。PCR 结束后，扩增得到的核酸用琼脂糖电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 进行分离。得到的结果再与已知菌株或种属进行比较。

16.4.2 凝胶电泳

与分离蛋白质相同,凝胶电泳也可以根据片段大小分离扩增得到的 DNA 或者 RNA。用限制性内切酶部分酶切后,琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物。在电场存在下,大片段的迁移速度比小片段慢。如果样品中包含了不同大小的片段,染色后会显示出一条一条的条带。利用分子大小、与基质的亲和力以及阴阳两级之间的电荷,进行分离。

凝胶一般是用从海藻中提取的多糖如琼脂糖,或是合成的聚合物如聚丙烯酰胺。聚丙烯酰胺的分辨率更高,分离范围可达几十到几百个核苷酸分子。

运用琼脂糖凝胶电泳时,先将多糖粉末溶解于沸水,再倒入一个制胶槽中,形成一定大小形状的凝胶。一旦凝固,将凝胶转移至含有电泳缓冲液的电泳槽中。将 DNA 点样至凝胶的不同泳道中,整个电泳槽中施加电场, DNA 片段进行迁移。因为 DNA 总体带负电荷,在电场中 DNA 片段会向阳极移动。小分子片段在凝胶中的迁移率更大,所以可以将大小片段依次分开,形成可见的条带。

将凝胶在溴化乙锭或其他 DNA 特异性染色剂中浸泡,可观察到条带。比如溴化乙锭可以插入碱基中间,在紫外灯下,溴化乙锭显出荧光,便于 DNA 的检测。与包含几条已知大小条带的 DNA 标准品比较,可以确定待测样品的大小和分布。溴化乙锭是强突变剂,使用时要注意安全。

虽然凝胶是电泳分离 DNA 的理想方法,但是它自身的物理性质限制了后续的操作。E. M. Southern 在 20 世纪 70 年代创建了新的 Southern 杂交技术。分离后的 DNA 被转移到一个弹性更好和易于控制的硝酸纤维素膜上,转移过程中不改变原来条带的相互位置。再选用合适的探针标记目的序列。Cocolin 等 (2001) 利用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析酒精发酵中的本土酵母。该作者报道,与其他方法不同, DGGE 不依赖于培养基的培养,可以直接定量分析。

16.4.3 定量聚合酶链式反应

定量 PCR (Q-PCR 或“实时” PCR) 可以检测通过聚合酶扩增得到的特异性 DNA 片段。就像经典的分光光度分析法,荧光核酸探针的信号强弱与反应过程中形成的 PCR 产物的量成正比。因为这个反应是“实时”的,定量 PCR 不需要 PCR 后处理过程,所以需时更短,更便于高通量检测。另外,定量 PCR 提供了一种快速鉴定酵母菌的方法 (Lavallée 等, 1994), 一天可以鉴定 30 或更多的菌株。

16.4.4 杂交探针

了解 DNA 的双链碱基对互补的特性以后,可以发明一种检测系统,采用外源寡核苷酸序列结合到目的互补序列上。这些寡核苷酸序列,又名“探针”,是

一些标记过的 DNA 或者 RNA, 它们和基因组上某一段区域序列互补。这样, 杂交可以是 DNA - DNA, DNA - RNA 或者 RNA - RNA。一旦合成了合适的探针, 在控制的反应条件下, 探针与靶位点之间反应的高保真度, 形成了高特异的诊断分析系统, 来比较或者鉴定相关的菌株或者特定微生物的特殊基因序列。许多商品化的试剂盒都运用 DNA 杂交探针技术来研究重要的食品病原体。

16.4.5 荧光原位杂交

荧光原位杂交也称为“FISH”, 运用荧光标记的核苷酸靶目的探针与基因组中的目的互补序列进行杂交。提高孵育温度, 核苷酸双螺旋解链, 然后与互补探针杂交, 在较低温下重新形成双螺旋结构。该方法的优点是可以在载玻片上以完整细胞形式进行操作。完成杂交后, 观察探针上的荧光信号, 确定靶 DNA 在染色体中的位置。Stender 等 (2001b) 报道使用 FISH 来鉴定葡萄酒中的酒香酵母, 另外还有一些实验者利用该方法来鉴定腐败酵母 (Kosse 等, 1997)。

16.4.6 核糖核酸分析

将 DNA 翻译成蛋白质, 需以 RNA 为中间物。这里, rDNA 基因被非转录区或者基因间区域分离。比如, 两段可变的转录区域 ITS1 和 ITS2 将保守的 18S、26S 基因与 5.8S 基因分隔开 (Musters 等, 1990)。可利用基因组中的某些序列来区分菌株或菌种 (Boekhout 等, 1994), 有些序列可用来区分“属” (Montrocher 等, 1998)。

可以根据间隔区的序列来设计多寡核苷酸探针, 鉴定特殊的微生物。Dlauchy 等 (1999) 运用酶切分析和 rRNA 中 18S 和 ITS1 区域的扩增反应, 鉴定了啤酒与葡萄酒中的 128 种酵母。Egli 和 Henick - Kling (2001) 发现 ITS1 和 ITS2 区域可以用来区分酒香酵母/德克酵母的种和菌株。

16.5 探针检测系统

多个能分析和大量与探针结合的核苷酸序列的荧光染料检测系统已经发展起来并且商品化。比如, 通用的、非特异性的 DNA 染料可以与双链 DNA 结合 (如探针 - 链的复合体或其他形式), 广泛用于凝胶电泳。更复杂的系统依赖于寡核苷酸探针与互补链结合后; 复合体能产生荧光。探针包括 TaqMan[®] 探针, 分子信标和 Scorpion[®] 探针。

16.5.1 TaqMan[®] 探针

TaqMan[®] 探针是带有荧光基团的寡核苷酸与 PCR 产物的内部区域杂交 (图 16.5)。合成这些引物时, 一端带有短波长荧光, 当其熄灭后, 另一端能发出长

波长荧光。杂交后，Taq 酶聚合过程中探针易被核酸内切酶降解。去除引物后，短波长荧光会加强而长波长荧光减弱。

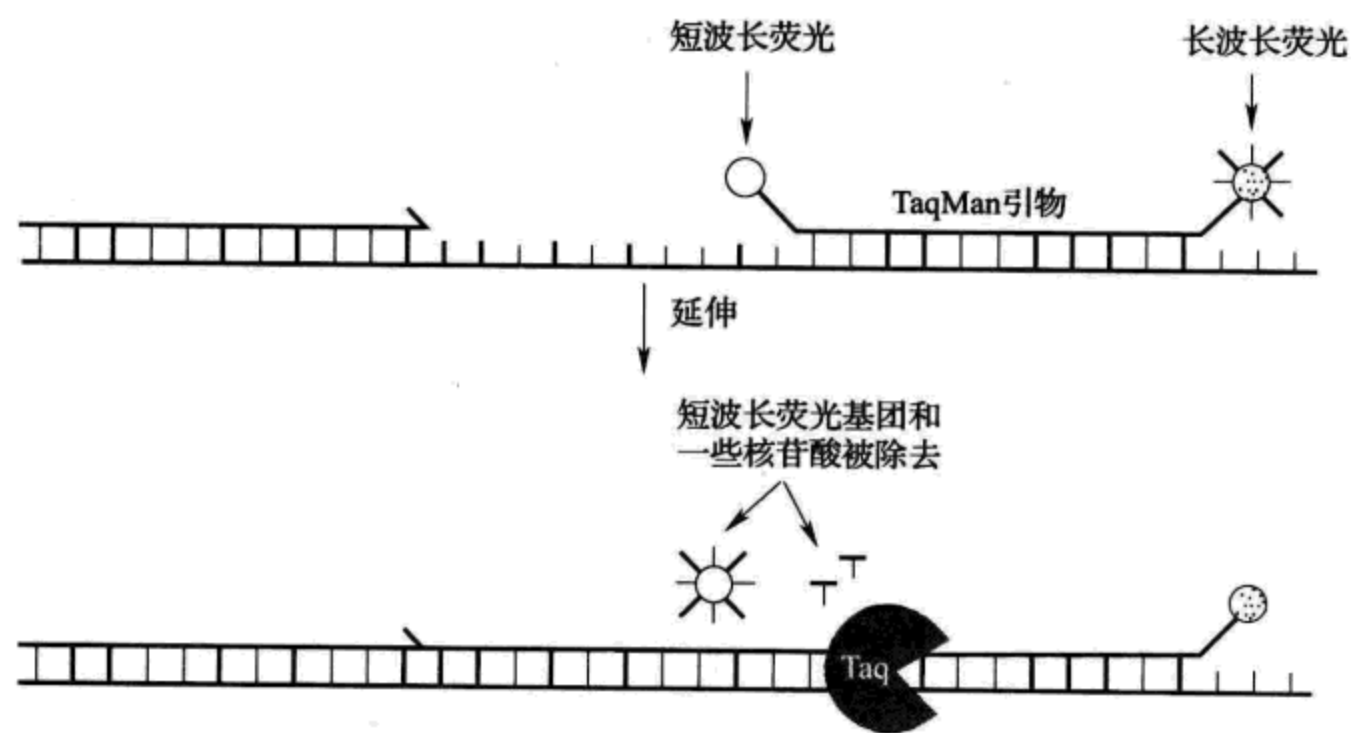


图 16.5 TaqMan 探针与靶 DNA 序列反应的典型图例

16.5.2 分子信标

另一种利用荧光和猝灭染料的信号系统是“分子信标”（图 16.6）。分子信标游离在溶液中，形成茎环结构。荧光基团和猝灭组分的接触阻碍发出荧光。当探针与靶位点杂交后，两种组分分离，染料被紫外激发发出荧光（如荧光基团形成信标）。与 TaqMan 探针不同，在扩增过程中分子信标保持完整，每轮循环时都必须与靶 DNA 重新结合才能用于信号检测。

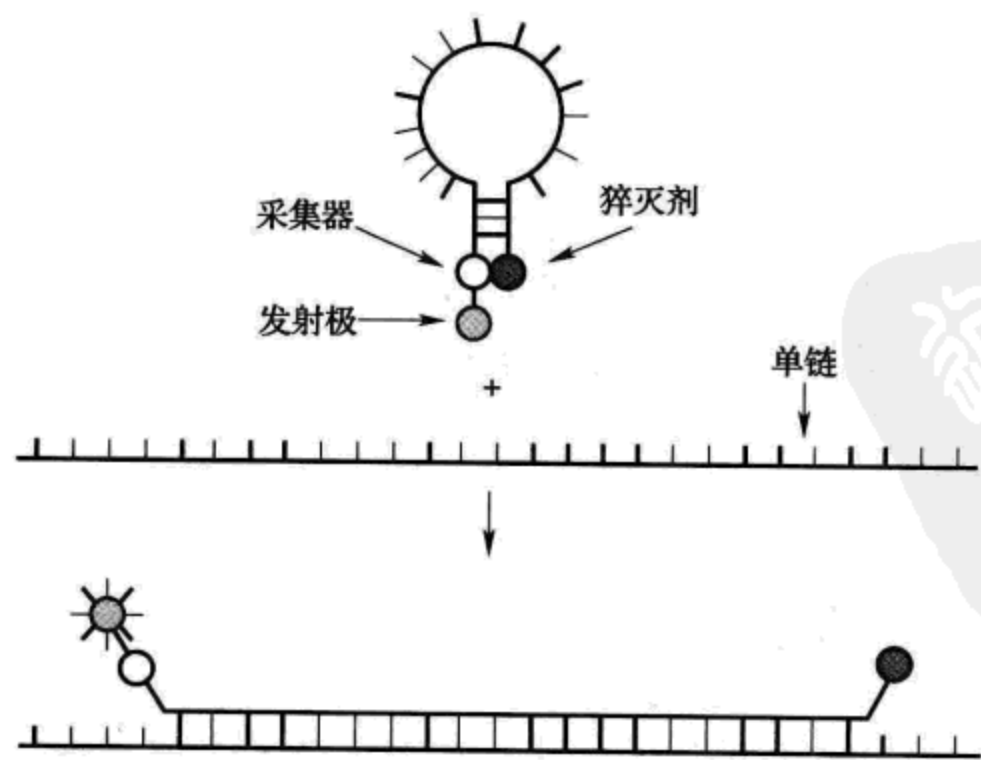


图 16.6 分子信标探针与靶 DNA 序列反应的典型图例

16.5.3 Scorpion 探针

所谓 Scorpion 探针，是因为寡核苷酸探针与蝎尾在形状上的相似性而得名 (Thelwell 等, 2000)。最近，Scorpions 探针技术引起了服务于葡萄酒工业的商业化实验室的广泛兴趣。利用 Scorpions 探针，运用荧光基团和猝灭成分 (图 16.7) 的寡核苷酸单链来检测具有特异性序列的 PCR 产物。一旦引物和靶位点结合，荧光基团和猝灭组分分离，其发卡结构打开，与新合成的互补序列结合。这个分离导致荧光基团产生的荧光强度增加。

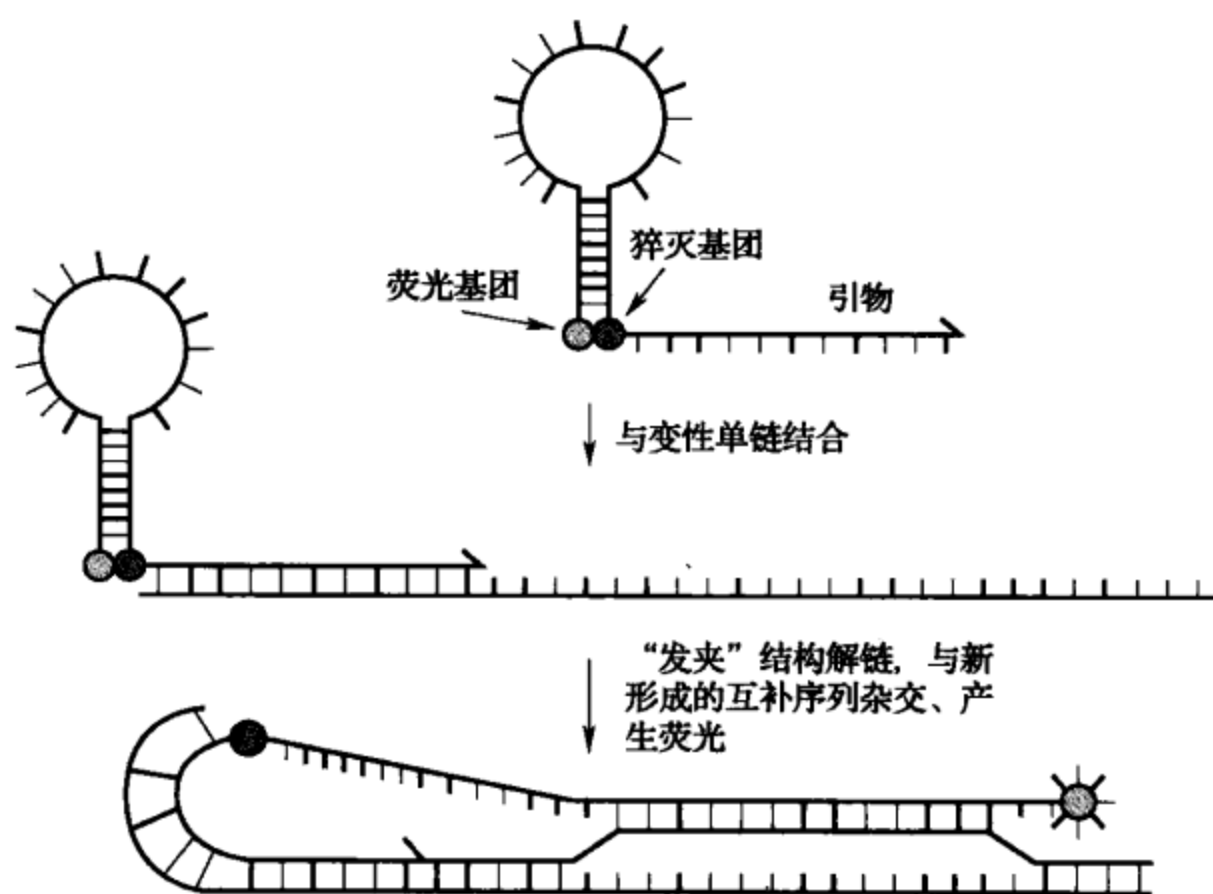


图 16.7 Scorpion 探针与靶目的 DNA 序列反应的典型图例

16.5.4 肽核酸化学发光原位杂交探针

运用肽核酸化学发光原位杂交探针 (Peptide Nucleic Acid Chemiluminescent In Situ Hybridization Probes 或 PNA - CISH), Stender 等 (2001b) 和 Connell 等 (2002) 成功地鉴定了布鲁塞尔德克酵母中 26S 核糖体 RNA 中的特异目标序列。Stender 等 (2001a; 2001c) 报道 PNA 探针模仿 DNA 探针，但是 PNA 探针的亲合性和特异性更强。

16.6 其他分子方法

Olive 和 Bean (1999) 综述了在过去 10 年中发展起来了许多其他基于 PCR 的鉴定方法。

16.6.1 限制性内切酶片段长度多态性

在菌群中,个体 DNA 微小的差异就导致了一个微生物与其他微生物的差异。所谓序列多态性,是指在 DNA 的基因非编码区域内发生了单个碱基对的变化,这种变化能被限制性内切酶识别。

利用限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP) 技术,通过 DNA 酶切的结果,鉴定种群中不同个体 DNA 之间的差异。所以,用一种限制性内切酶处理两个不同个体的 DNA 酶切,将会得到不同长度的片段。而群体中不同微生物之间这些片段的长度分布是不同的。片段长度分布的异同性可用来区分和鉴别不同菌种甚至不同菌株 (Johansson 等, 1995; Cocolin 等, 2002)。

分离 RFLP 试验需足够量的 DNA,耗费时间和人力。而 PCR 可以在 2 ~ 3h 内从微量 DNA 扩增出大量的 DNA,所以一般可以将两者联合使用 (PCR - RFLP)。Granchi 等 (1999) 证明了 PCR - RFLP 在检测、定量和鉴定酵母菌种中极其有效。作者报道,常规分离、计数和鉴定方法需一周或更长时间,而该技术仅需 30h,就可获得相同的结果。最近, Cocolin 等 (2002) 和 Baleiras - Couto 等 (2005) 还用该技术监控红葡萄酒发酵过程中的酵母生态。

16.6.2 脉冲场凝胶电泳

脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分离限制性内切酶处理后的微生物 DNA 片段 (Arbeit 等, 1990; Finney, 1993; Kelly 等, 1993; Maslow 等, 1993)。分离后得到的片段再与已有微生物脉冲场凝胶电泳的图谱比对。虽然该方法可分离 10 ~ 2000kb 的高分子片段,但是区别各个菌株效果却很不理想。另外,该技术存在健康和安全隐患 (Richmond 和 McKinney, 1993)。PFGE 需要加入溴化乙锭染色观察分离效果;而且与用于分离小片段的传统琼脂糖电泳 (1 ~ 5V/cm) 相比,它需要更高的电压 (5 ~ 10V/cm) (Tenover 等, 1995)。

16.6.3 其他方法

Williams 等 (1990) 报道,随机扩增多态 DNA - PCR (RAPD - PCR) 是 PCR 的衍生方法,它利用寡核苷酸探针 (9 ~ 12 个碱基对或 bp) 扩增基因组的某些区域,电泳分离扩增产物。该法取决于引物序列和反应条件。利用高特异性寡核苷酸引物可以提高 RAPD - PCR 的特异性。Holt 和 Cote (1998) 运用该技术鉴定了葡聚糖生产菌的酒球菌, Esteve - Zarzoso 等 (1998) 鉴定了清酒酵母和接合酵母。Quesada 和 Cenis (1995) 运用该方法测定了葡萄酒中酵母的性质。

微生物基因组中包含随机的、分散的、重复的 DNA 序列,它们具有菌株特异性,因此可以作为菌株的基因指纹图谱 (Versalovic 等, 1991; 1994; 1998)。原理是:设计与散在的重复序列互补的外向寡核苷酸引物进行 PCR,对这些重

复序列之间相应的不同长短 DNA 序列进行扩增,电泳后发现菌株特异性的 DNA 指纹图谱。

多位点序列分型 (MLST) 是一种通过比较看家基因片段 450bp 左右的内部序列来区分细菌菌株的方法。

16.7 染色体外的元件 (卫星 DNA)

很多活细菌,包括葡萄酒细菌和酵母,都能够被染色体外的核酸元件,即所谓的“可变数目串联重复序列”(VNTR)或“卫星”所感染。它们对宿主菌的重要程度各异 (Cocaign - Bousquet 等, 1996)。在许多致病性微生物中,这些 VNTR 编码抗原变异基因,其中一部分利于宿主进行适应性进化 (Moxon 等, 1994)。对于葡萄酒中的酵母和其他细菌,它们的作用还不清楚。据推测,它的一个可能的作用是在葡萄酒酵母菌株中形成致死蛋白质 (Schmitt 和 Neuhausen, 1994)。卫星的存在还可以用来评定菌群的基因多样性 (Schmitt and Neuhausen, 1994)。

细胞内的亚病毒元件包括单链 DNA 或者单链/双链 RNA。因为卫星不包含能够编码蛋白质的核酸序列,所以它们需要依靠其他一些“辅助病毒”来完成它们的功能。如果这些病毒不存在,则卫星就会被截留在宿主细胞内。

在酵母菌中,卫星的核酸片段很短 (Pupko 和 Graur, 1999),所以这些片段被称为“微卫星”。它们是存在于染色体上的 2~5 个核苷酸不等的简单串联重复序列 (Young 等, 2000)。由于它们存在于染色体上,所以它们的复制过程取决于宿主菌。

由于微卫星的核酸序列与宿主染色体不同,它可以用作遗传标记,用于菌株鉴定 (Tautz, 1989)。Baleiras - Couto 等 (1996) 运用 PCR 扩增微卫星核酸序列,以此鉴定了导致食品腐败的拜氏接合酵母和 *Z. bisporous*。Gonzalez - Techera 等 (2001) 和 Perez 等 (2001) 也报道葡萄酒中酵母中微卫星标记多态性的区别与鉴定。

微卫星 DNA 体现出显著的变化性和稳定性,这源于生物进化过程中的高突变率 (Sia 等, 1997; Young 等, 2000)。但是,并非所有串联重复序列都具有多态性,因此运用串联重复序列标记作为菌株关联性的基础时需加以注意。

与运用其他分子方法类似,微卫星蛋白质的分离和鉴定需要相应的分子生物实验室,并配备相应的设备和技术人员。然而,这些实验最终都会商品化形成相应的试剂盒。这样,大多数实验室都能利用葡萄酒酿造微生物的卫星信息来快速鉴定微生物。

第 17 章 化学和物理不稳定性

17.1 引言

有些情况下，瓶装酒或果汁中通过显微镜观察到的沉淀或浑浊可能由其他因素导致，却被误认为是微生物引起的。以下一些方法可以用来区分微生物和其他因素引起的沉淀，也能确定可能的沉淀原因。

非微生物因素引起的不稳定性包括形成结晶状、类结晶状、纤维状或无定形的沉淀（见表 17.1）。分析原料以及复核生产记录有助于确定沉淀原因。若出现少量沉淀或浑浊，应利用离心或小规模过滤收集沉淀物。或者将酒瓶竖直放置数小时，然后小心地收集沉淀物进行分析。

表 17.1 果汁和葡萄酒中典型的非生物沉淀	
外观	可能原因
结晶状	酒石酸钾、酒石酸钙或草酸钙
类结晶状	软木屑或硅藻土
纤维状	纤维、石棉或棉绒
无定形	蛋白质、苯酚、多糖（葡聚糖、胶质、淀粉）或金属破败

17.2 结晶不稳定性

17.2.1 酒石酸盐

酒石酸钾和酒石酸钙等不溶性盐有时会在酒瓶中形成不同大小（与形成过程相关）和颜色（红色或白色）的水晶状沉淀。尽管这是一种正常的自然现象，但许多消费者认为这是质量问题，因为酒石酸盐一般看起来像玻璃状。有关这些沉淀的形成原因以及生产过程中如何防止或延迟沉淀形成的相关细节可以参考 Zoecklein 等人的文章（1995）。

从普通酒中收集到结晶物后，可直接在明视野或相差显微镜下进行油镜检查。图 17.1A 为红葡萄酒中酒石酸钾结晶物，图 17.1B 为白葡萄酒中酒石酸钾结晶物，图 17.1C 为乙醇溶液中添加酒石酸、氯化钾配制成的模式酒。

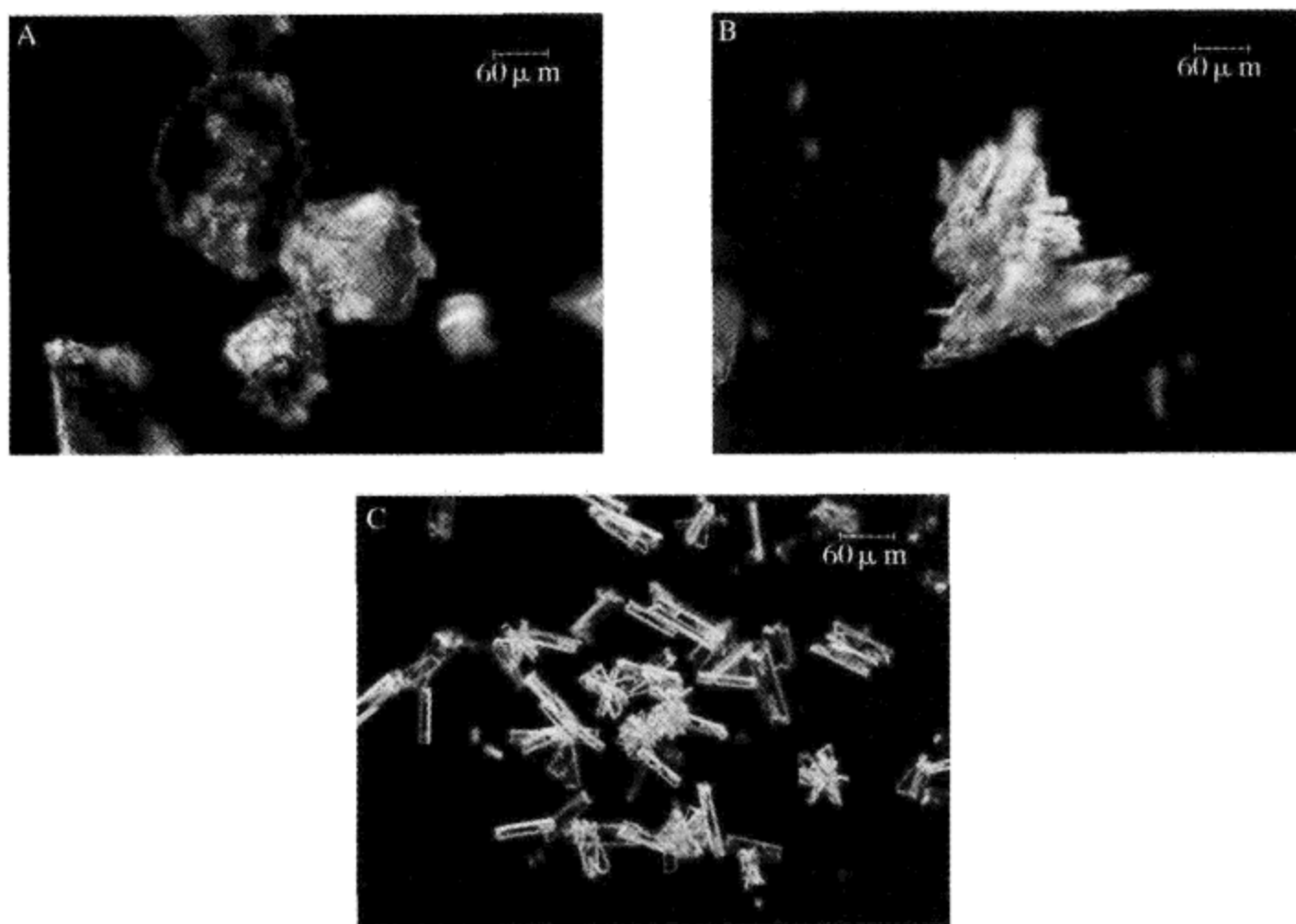


图 17.1 相差显微镜观察到的酒石酸钾沉淀（放大倍数：100 ×）

A. 红酒；B. 白葡萄酒；C. 实验室制备的酒样（图片由 R. Thornton 和 E. Akaboshi 提供）

除了显微观察外，也可进行化学检测。17.2.1.1 中所描述的方法是检测酒石酸盐结晶物的常规方法，加入稀硫酸和偏钒酸盐后结晶物变为橘黄色（Quinsland, 1978）。17.2.1.2 中描述的方法是利用在不同 pH 时阴离子（酒石酸盐或酒石酸氢盐）相对分布的不同，来区分酒石酸钾和酒石酸钙。因此，pH 6.0 时酒石酸钙形成晶体，pH 3.6 时酒石酸钾形成沉淀。17.2.1.3 中叙述的方法是通过观察到细长形、纤维状 CaSO_4 沉淀物来确认酒中钙离子的存在。

17.2.1.1 酒石酸盐

1. 配制反应试剂

将 1 体积的浓硫酸加入 3 体积的蒸馏水中，配制成 (1 + 3) H_2SO_4 溶液。在 100mL 容量瓶中用大约 70mL 温热蒸馏水 ($<70^\circ\text{C}$) 溶解 3g 固体偏钒酸钠，待溶液冷却后进行定容。因为偏钒酸钠不能完全溶解，溶液使用前必须利用 Whatman 2 号或同等型号滤纸进行过滤。

2. 过滤或离心收集部分酒样中疑似沉淀物。

3. 用蒸馏水洗涤收集的沉淀，然后转移到膜过滤系统上并进行抽真空。

4. 将膜转移到表面玻璃上，或者将结晶物收集后放到点滴板。

5. 在沉淀物上加一滴稀释好的 H_2SO_4 和一滴偏钒酸钠溶液，检查沉淀物颜色的变化。

17.2.1.2 酒石酸钾和酒石酸钙的区分

1. 配制 500g/L NaOH 溶液和 12mol/L HCl。

2. 离心收集沉淀并转移至小测试管内。
3. 加入足够的酸或 NaOH 分别调节 pH 至 3.6 和 6.0, 并进行冷藏。

17.2.1.3 酒石酸钙的确认

1. 在 10mL 酒中加入少量的固体草酸（用刀尖挑一点即可），有晶体形成则表明酒中可能含有钙离子。
2. 若加入几滴 12mol/L H_2SO_4 , 沉淀溶解则证明酒中含有钙。加入 3 ~ 5mL 甲醇并稍加热，钙离子会形成 CaSO_4 沉淀。

17.3 类结晶不稳定性

17.3.1 软木屑

检查样品中软木屑的推荐方法是利用能与软木塞中结构性高分子木质素进行反应的一种染料。需要彩色显影分析时，应选择明视野显微镜而不是相差显微镜进行观察。

通过显微观察可以发现，染色后软木屑的细胞如同红色的类结晶体集合体（图 17.2）。尽管通过此方法，软麻布也可以被染成红色，但后者在显微镜下观察时呈纤维状（Quinsland, 1978）。



图 17.2 相差显微镜下观察的软木屑（放大倍数：100 ×）
（图片由 R. Thornton 和 E. Akaboshi 提供）

1. 将 2g 间苯三酚溶解于 100mL 12mol/L HCl。该染色液是近饱和溶液，将上清液轻轻倾入其他容器，以除去未溶解的晶体颗粒。染色液需现配现用。
2. 膜过滤收集含有碎片的部分酒样。
3. 用染色液湿润过滤器和沉淀物，使沉淀物在染色液中浸润至少 5min。
4. 真空干燥去除染色液，使用蒸馏水洗涤，最后在显微镜下观察沉淀物。

17.3.2 硅藻土

硅藻土是海水和淡水中的硅藻类植物死亡后遗骸形成的化石性沉积物。在葡萄酒厂，硅藻土一般作为助滤剂，但有时也可能穿出过滤介质进入酒中。显微观察可以很容易地发现酒中的硅藻土。

1. 通过离心或过滤收集沉淀物。
2. 将沉淀物转移到显微镜下进行观察，并与图 17.3 进行对比。

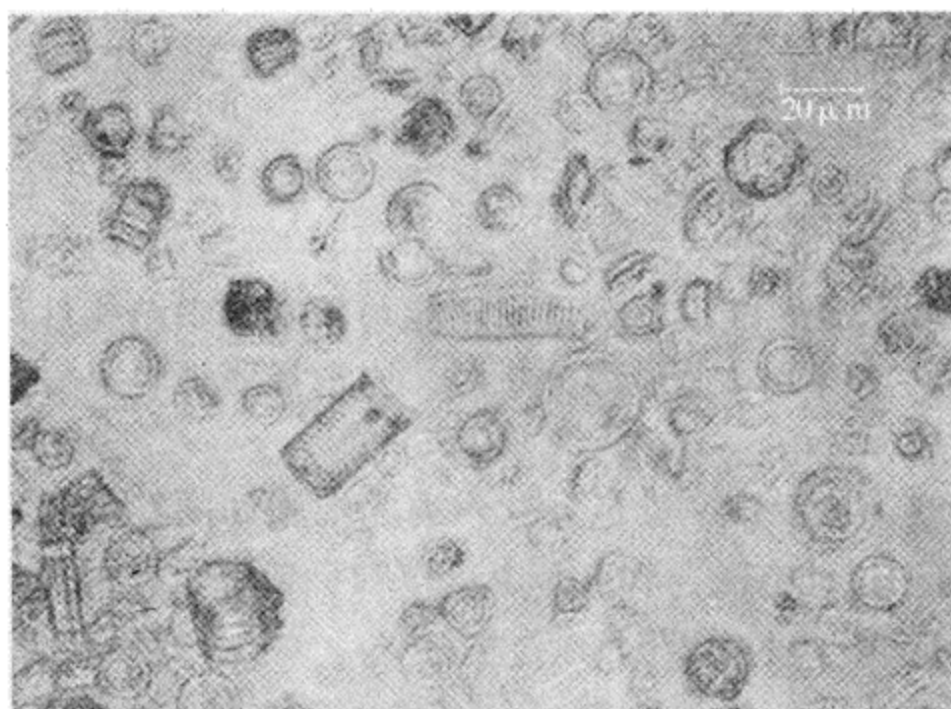


图 17.3 相差显微镜下观察到的硅藻土（放大倍数：400 ×）
（图片由 R. Thornton 和 E. Akaboshi 提供）

17.4 纤维状物不稳定性

在瓶装酒中发现的纤维材料一般是来源于过滤介质或灌装前瓶中残留的滤布纤维。含有木质素成分的滤布在显微镜下呈现为红色的纤维物质，纤维组分被碘碘染色剂染色后呈淡蓝色。与赫尔茨伯格染色法类似，由于碘碘染色 30min 后，颜色强度将下降，所以染色后及时进行显微观察可获得满意结果（Quinsland, 1978）。石棉纤维均不可被以上两种方法染色。

1. 将 2g 间苯三酚溶解于 100mL 12mol/L HCl，制得染色液。该染色液是近饱和溶液，将上清液轻轻倾入其他容器，以除去未溶解的晶体颗粒。染色液需现配现用。

2. 纤维素染色液的配制：200g 氯化锌溶解于 100mL 蒸馏水中，并加入 20mL 碘液（10g KI 和 4g I₂溶于 100mL 蒸馏水中）。

3. 将含有沉淀的酒样在两个独立的滤膜上分别进行过滤。

4. 使用间苯三酚染色液浸润第一个滤膜和沉淀，染色液和沉淀接触至少

5min。

5. 真空干燥去除染色液，用蒸馏水洗涤沉淀，然后使用显微镜进行观察。
6. 使用纤维素染色液浸染第二个滤膜和沉淀，染色至少 5min。
7. 真空干燥去除染色液，用蒸馏水洗涤沉淀，然后使用显微镜进行观察。

17.5 无定形物不稳定性

显微观察时，此类沉淀物缺少典型的形态特征，一般具有葡萄酒反射的颜色。此类沉淀物包括蛋白质、多酚类物质（以及两者结合形成的复合物）、多糖（葡聚糖、胶质、淀粉）、金属破败（铜和铁）。

17.5.1 蛋白质

酒中蛋白类物质经氨基黑 10B 染色后变为蓝黑色，按 17.5.1.1 中方法 A，用曙红 Y 染色后变为粉红色。17.5.1.2 中方法 B 的原理是基于蛋白质和单宁酸反应后会产生可见的浑浊或沉淀。在方法 B 中，与对照样品相比，处理后的样品产生明显的浑浊，表明酒样中存在不稳定的蛋白质（见图 17.4）。

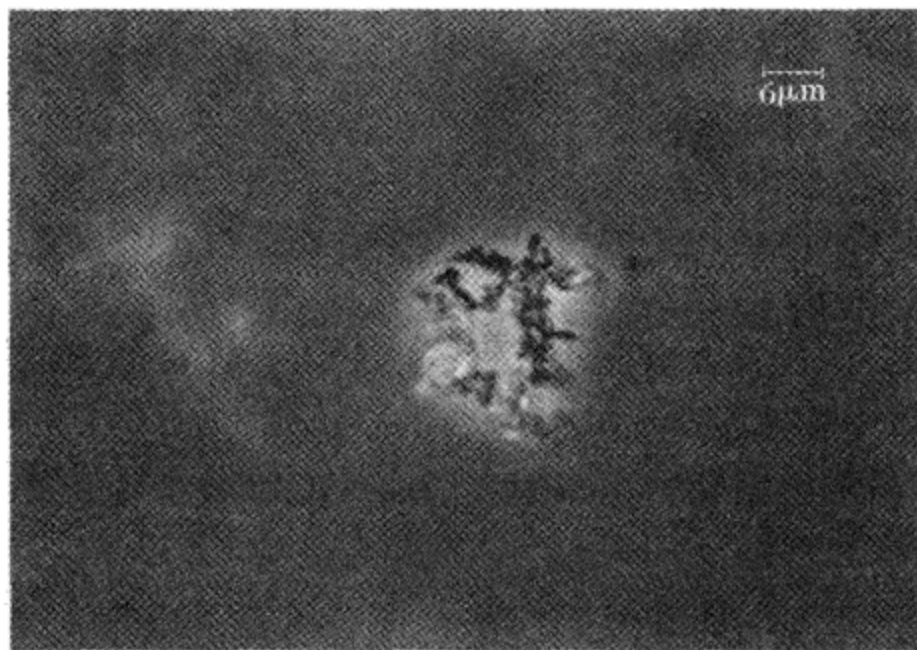


图 17.4 相差显微镜下观察到的酒中蛋白质（放大倍数：1000 ×）
（图片由 R. Thornton 和 E. Akaboshi 提供）

17.5.1.1 蛋白质方法 A

1. 配制染色液
 - a. 2g 氨基黑 10B（又名萘酚蓝黑）溶解于 100mL 甲醇 - 醋酸溶液（90mL 甲醇 + 10mL 17.4mol/L 醋酸）。
 - b. 2g 曙红 Y（又名红酸 87）溶解于 100mL 甲醇 - 醋酸溶液（90mL 甲醇 + 10mL 17.4mol/L 醋酸）。
2. 使用聚碳酸酯膜过滤样品沉淀物。由于蛋白质染色液存在时醋酸纤维膜不稳定，所以不能选用其进行过滤。

3. 将膜放置在过滤设备上,用染色液湿润、染色至少 10min。

4. 真空干燥滤膜,小心地用甲醇-乙酸溶液(90mL 甲醇 + 10mL 17.4mol/L 醋酸)洗涤去除多余的染色液,直至滤膜变为白色,最后进行显微观察。

17.5.1.2 蛋白质方法 B

1. 在 100mL 容量瓶中加入 1g 单宁酸,用 70% (体积分数) 乙醇溶解。

2. 向 100mL 疑似酒样中加入 5mL 单宁酸溶液,观察是否有浑浊物形成。

17.5.2 多酚类物质

一般采用福林-肖卡试剂检测多酚类物质。考虑到购买化学试剂和准备时间,推荐选用商品化的试剂盒。不管是购买的试剂盒或自己配制的试剂,溶液应该是纯黄色,不能含有任何蓝绿色。为使长期储存的福林-肖卡试剂重新氧化,可以在通风橱内向试剂中加入几滴溴,小心地加热重沸。

当按照酚类方法 A (见 17.5.2.2) 检测时,酚类复合物将会溶解,并生成暗灰或深蓝色浑浊溶液。按照方法 B (见 17.5.2.3) 分析时,样品中的多酚类物质(色素和单宁酸)变为暗红色。碳化作用、黑色木炭类似物的形成表明蛋白质的存在。

17.5.2.1 福林-肖卡试剂

1. 将 700mL 蒸馏水加入 2L 圆底烧瓶中,并加入 100g 钨酸钠和 25g 钼酸钠。

2. 待钨酸钠和钼酸钠完全溶解后,小心地加入 50mL 15mol/L 磷酸和 100mL 12mol/L HCl。

3. 向烧瓶中加入几粒玻璃珠,放置在电炉上,连接回流冷凝器并打开冷却水开关,在排风罩中加热至少 10h。

4. 回流后,冷却内容物,用蒸馏水洗涤冷凝管残余物,并将洗涤液收集到烧瓶中。

5. 加入 150g $\text{LiS} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和几滴溴水,在排风罩下煮沸 15min,冷却后用蒸馏水定容至 1L。

6. 使用 Whatman 1 号滤膜过滤溶液,储存于棕色瓶中。

17.5.2.2 酚类检测方法 A

1. 通过膜过滤收集未确认的沉淀物。

2. 配制或购买福林-肖卡试剂(见 17.5.2.1)。

3. 用蒸馏水洗涤沉淀物,并用刀片将沉淀物转移至表面玻璃上。

4. 在沉淀物上加入稀释后的(1:10)福林-肖卡试剂,观察颜色变化。

17.5.2.3 酚类检测方法 B

1. 在小试管中收集部分沉淀物。

2. 向试管中加入 1mL 浓硫酸,在水浴中温和加热,注意安全。

3. 观察试管内物质颜色变化。

17.5.3 葡聚糖、果胶和淀粉

葡萄酒或果汁中存在的多糖（葡聚糖、果胶、淀粉）可能会对澄清或过滤产生一定影响，当葡聚糖浓度高于3mg/L时，将严重阻碍过滤和澄清。

葡萄孢属真菌和一些腐生乳酸菌能产生葡聚糖，后者会导致葡萄酒发黏（见11.3.9）。Dubourdieu等（1981）提出了两种在不同浓度水平检测葡聚糖的方法。当浓度大于15mg/L时，使用方法A（见17.5.3.1），浓度低于15mg/L时，使用方法B（见17.5.3.2）。在两种方法中，纤维丝状线团的出现表明葡聚糖的存在。

在酒精溶液中形成凝胶体，表明胶质的存在（见17.5.3.3）。最后，试管中的紫罗兰色几分钟后消失，说明存在淀粉（见17.5.3.4）。

17.5.3.1 葡聚糖方法 A

1. 在100mL容量瓶中加入1mL 12mol/L HCl，用95%（体积分数）的乙醇定容至100mL。

2. 在试管（规格：18mm × 150mm）中加入10mL待测酒样，加入5mL配制好的乙醇-盐酸溶液。

3. 观察是否形成纤维丝状线团。

17.5.3.2 葡聚糖方法 B

1. 在100mL容量瓶中加入1mL 12mol/L HCl，用95%（体积分数）的乙醇定容至100mL。

2. 将5mL待测酒样和5mL乙醇-盐酸溶液在试管（规格：18mm × 150mm）中混合。

3. 室温放置30min，将混合物3000 × g离心20min。

4. 如有沉淀出现，弃掉上清液，将沉淀重新溶解于1mL蒸馏水中。

5. 加入0.5mL乙醇-盐酸溶液，并观察是否有纤维丝状线团的形成。

17.5.3.3 果胶

1. 在100mL量筒中混合1mL 12mol/L HCl和90mL 95%（体积分数）乙醇（或异丙醇），并用95%（体积分数）乙醇（或异丙醇）定容至100mL。

2. 在另外一个100mL量筒中，加入含有疑似沉淀的酒样和50mL乙醇-盐酸溶液（或异丙醇）。

3. 静置60min后检查是否形成凝胶体。

17.5.3.4 淀粉

1. 在100mL容量瓶中用80mL蒸馏水溶解2g KI和0.1g I₂，并用蒸馏水定容至100mL。

2. 在试管（规格：16mm × 125mm）中加入1mL步骤1中配制好的碘液和

10mL 待测果汁或酒样。

3. 检查是否形成紫罗兰色，在红色果汁或酒中较难观察到该颜色。

17.5.4 金属危害

金属离子引起的变质现在已经相对较少了，一般都为铁或铜引起的破败病。在瓶装酒或者低氧下储存的酒中，铜破败病引起的浑浊先为白色，然后变为红褐色。铁破败病包括两种，白色破败病（生成磷酸铁白色沉淀）和蓝色破败病（生成单宁酸铁蓝色沉淀）。尽管由磷酸铁带来的危害被描述为白色破败病，但有时在白葡萄酒中会形成蓝色的无定形沉淀。在含有高浓度铁离子的白葡萄酒中添加单宁酸后，单宁酸铁蓝色沉淀会成为很大的麻烦。在红葡萄酒中单宁酸铁蓝色沉淀起初为蓝色的云状物，最终会变为蓝色沉淀。

用 10%（体积分数）HCl 酸化待测酒样，有助于区别金属离子复合体沉淀与蛋白质（见 17.5.1）和多酚类物质沉淀（见 17.5.2）。如果检测方法第 5 步时浑浊溶解，沉淀很可能是由金属离子引起的，并可通过进一步实验确定是铜或铁引起的沉淀（见 17.5.4.2）。如果沉淀不消失，则可能是由蛋白质、蛋白质复合体、蛋白质-多酚、多醛-多酚引起的沉淀。最后，17.5.4.3 中描述的方法可以用于确定疑似酒样是否存在灌装后产生破败的现象。

17.5.4.1 初步测试

1. 在 100mL 容量瓶中加入 0.5g 亚铁氰化钾和 95mL 蒸馏水，待完全溶解后，用蒸馏水定容至 100mL。
2. 将 12mol/L HCl 稀释成 10%（体积分数）HCl。
3. 在试管（规格：18mm × 150mm）中加入 15mL 待测酒样。
4. 加入 3 ~ 5mL 10%（体积分数）HCl，并观察浑浊是否溶解。
5. 如果浑浊溶解，则可能是金属离子引起的变质。

17.5.4.2 变质的确认

1. 在试管（规格：18mm × 150mm）中加入 15 ~ 20mL 待测酒样。
2. 加入 5 滴 30%（体积分数）H₂O₂。
3. 如果步骤 2 中浑浊溶解，则可能是铜离子引起的变质。离心酒样，将沉淀收集在实验室不锈钢刮刀上，通过煤气喷灯加热慢慢干燥沉淀物。待沉淀完全干燥后，尝试使用强火焰点燃沉淀物。如果浑浊物是由铜和有机物组成的，则沉淀会部分燃烧；如果沉淀为无机物（硫化铜和磷酸铁），则沉淀不会燃烧。
4. 如果沉淀在步骤 2 中不消失，将 20mL 浑浊的酒样分装到两只试管中。
5. 在第一只试管中加入 5mL 5g/L 亚铁氰化钾，若有红色物质出现，则说明样品中含有铜或相应复合体。
6. 在另一只试管内加入 5mL 5g/L 亚铁氰化钾和 5mL 10%（体积分数）HCl，若有蓝色物质生成，则说明样品中含有铁。

17.5.4.3 预灌装

1. 在三支试管内分别加入 10mL 酒样。试管 A 中加入柠檬酸（终浓度：0.7g/L）和几滴 3%（体积分数） H_2O_2 。试管 B 中加入几滴 3%（体积分数） H_2O_2 。试管 C 中加入几滴 100mg/L 硫化钠溶液。

2. 剧烈振荡试管 A 和 B，使溶液充分接触空气，第 2 天进行观察。若形成浑浊或沉淀，说明有产生铁破败病的可能性。如果加入了柠檬酸和 H_2O_2 的试管 A 中没有出现浑浊，可尝试向酒中添加柠檬酸进行预防。若试管 C 中形成浑浊，则表明铜离子浓度大于 0.5mg/L，即可能产生铜破败病。



第 18 章 实验室布置

18.1 引言

实验室空间大小不一，小到一个壁橱，大到装备良好的 92m²甚至更大的工作区。一个实验室常规布置包括水槽、工作台、公用设施（水和气的管道排布、电源线路设计、蒸馏水、抽真空装置）、储存室（干燥区、冷冻区、化学试剂、培养基、玻璃器具），以及高压灭菌锅釜、通风橱、层流净化罩、摇床等仪器放置的空间（见图 18.1）。

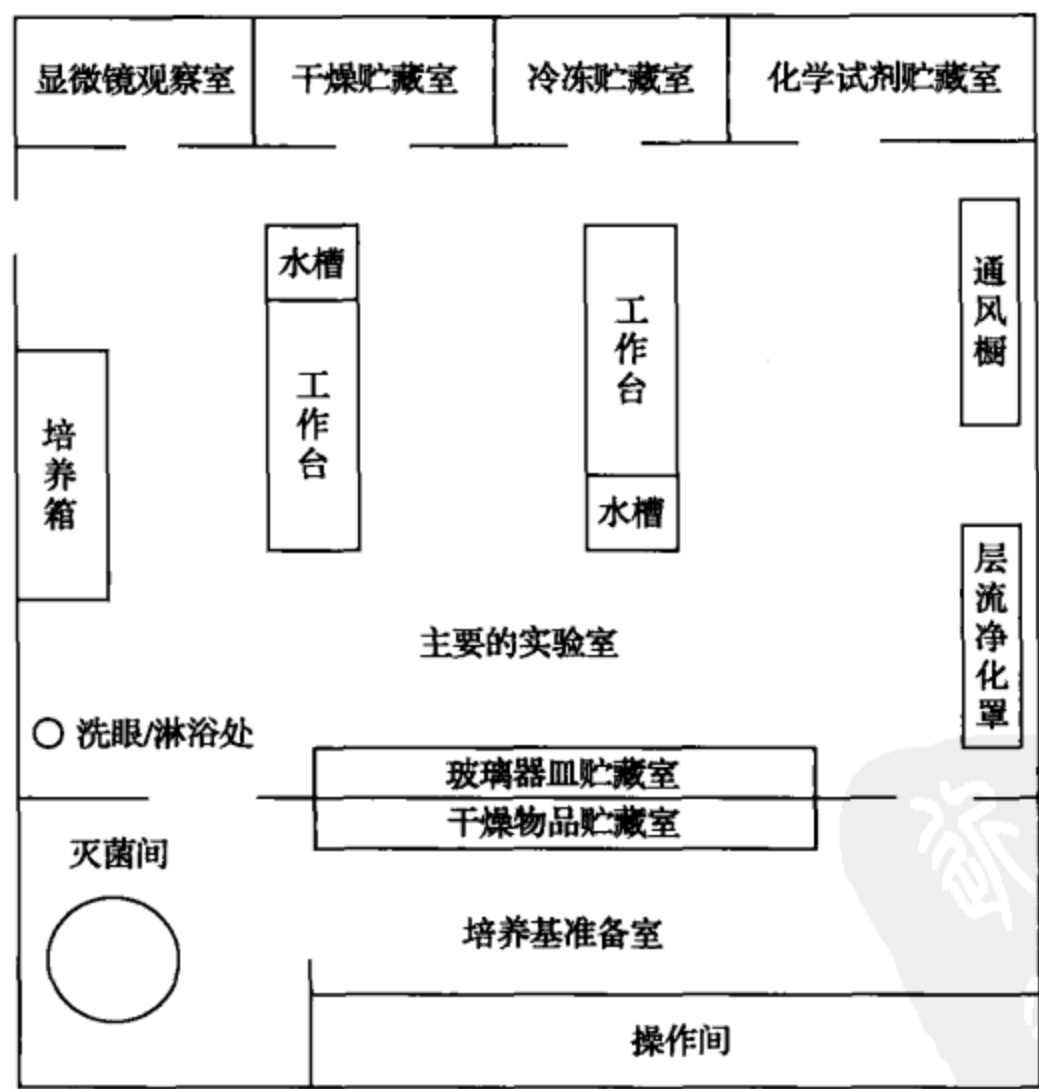


图 18.1 葡萄酒酿造微生物实验室的布置

微生物操作员面临的最大问题是染菌，尤其是来自空气中的微生物。工厂实验室一般使用层流净化罩来减少染菌，它可以为进行微生物培养和分析等操作提供局部的无菌环境（见 18.10）。尽管该设备比较昂贵，但它可以减少由培

培养基染菌引起的损失，同时减少员工时间和精力浪费。

实验室内特殊设计的培养基准备室也可以减少空气中微生物引起的污染。该区域的典型特征是房间内部的空气压力大于外部。由于压力不同，空气将从此区域流出，减少实验室其他区域空气微生物的进入。经过过滤的空气才能进入培养基准备室。

18.2 显微镜和 pH 计

显微镜和 pH 计是葡萄酒酿造微生物实验室中两种非常重要的仪器。正如第 12 章所讨论，相差显微镜是检测发酵过程和确定潜在腐败物质的重要工具。pH 计也同等重要，它可以用来进行常规检测，调节果汁或葡萄酒的 pH，为计算分子态 SO_2 的浓度提供基础信息（见 5.2.1）。而且 pH 计在实验室中也被用来调节溶液或培养基的 pH。pH 计的校准一般使用商业化的预先配制的缓冲液，大多数是 pH4 和 pH7 的两种溶液。一个高质量 pH 计的价格近 2000 美元。

18.3 灭菌锅

能够对实验室培养基、玻璃器皿和其他不同物品进行蒸汽灭菌，是实验成功的必要条件。但一般灭菌锅的价格与显微镜的价格不相上下，大部分需要人工操作的小容量灭菌锅大约需要 3000 美元，大容量自动化灭菌锅甚至需要 10000 美元。除了容量以外，加热和加压循环的可调性及排气能力等性能指标也影响其价格。除了灭菌锅的花费外，其他附件如托盘、检测灭菌参数的测试条、可以灭菌的袋子和操作热容器用的手套等也是灭菌操作所必需的。

蒸汽具有高度的腐蚀性，能损耗阀门、封条或灭菌锅的其他部分。所以每年专业技术人员必须至少对灭菌锅进行一次全面的维修。

18.4 离心机和过滤器

很多实验室一般在显微观察前将样品浓缩。这可以通过离心或过滤来实现，或者根据悬浮物的密度以及实验的安排，简单地将容器正置过夜，以达到目的。若怀疑样品中存在微生物不稳定性，可以取少量样品（0.1mL 或 1.0mL）直接涂布平板即可（见 14.5）。

若种群密度比较低（如灌装线），样品可以通过膜过滤进行浓缩（见 14.5.3）。根据实验样品的体积，一个 300mL 带有支架的玻璃漏斗和一个真空瓶已足以实现样品的浓缩。当样品体积更大时，可能需要花费更大价钱购买 4~6 个真空吸头构成的多管路系统。同时，多个公司推出了相对廉价、易于操作和

处理、适合葡萄酒厂使用的过滤系统。

不同离心机一次离心所能处理的样品数量和样品体积不同，同时速度控制选项、计时器、温度控制也不尽相同。台式医用离心机可以产生 $3000 \times g$ 或者更大的相对离心力，价格在 1500 ~ 10000 美元不等。为减少破损，推荐使用塑料离心管，而不是比较昂贵的玻璃离心管。因为离心机能够容纳偶数个离心管或小瓶 (≥ 4)，离心轴的相对方向上必须放置等重的物品，以保持平衡。离心管或离心瓶的最大重量差异可以在产品说明书上查阅。

18.5 培养箱

通用的培养箱具有不同的容量、温度和特殊的检测设备（如相对湿度）。对葡萄酒酿造微生物操作员而言，幸运的是大多数酿酒微生物在室温下即可正常生长（大约 25°C ）。但当日夜温差比较大时，就需要培养箱来维持恒定温度。

大多数通用培养箱的工作温度都要高于周围环境。因此，设置为 27°C 的培养箱就不能在 30°C 或更高的室温下正常运行。如果需要在低于环境温度的条件下运行，就需低温培养箱或者提供低温环境，但价格一般都比较昂贵。虽然在成本上具有优势，但实验室的干燥箱不能改用于微生物培养，因为干燥箱的最适工作温度一般都远高于微生物生长温度。

有些酿酒微生物（如乳酸菌）在微氧条件下生长较好，可以去除空气中氧气的特殊培养箱现在也可以购买到。但这种恒温箱用起来比较昂贵。幸运的是，酿酒厂可将厌氧罐或蜡烛罐作为替代品使用。厌氧罐选择 GasPak[®] 厌氧系统（巴尔的摩生物实验室），操作简便，体积小巧，携带方便，能够容纳 36 个培养皿。这些系统主要是依赖于化学反应消耗氧产生 H_2 或 CO_2 。

“烛罐”价格远低于 GasPak[®] 系统，它是具有紧密封盖的广口玻璃瓶，体积大约有 1 gal (3.785 L)。当培养皿被放入罐里，罐中的小蜡烛被点燃。封口后，蜡烛燃尽罐中大多数氧气直至熄灭。

18.6 水浴锅

使用热培养基进行倾注或者涂布平板时，有必要使熔化的琼脂培养基保持或回火到 $45 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 。利用水浴锅，可以很容易地控制温度。根据容量和控温的精度 ($\pm 0.50^{\circ}\text{C}$)，水浴锅的价格从 1000 ~ 5000 美元不等。一个加有水的大烧杯 (1 L) 在电炉上进行加热，也可以作为小型水浴锅的替代品。

18.7 玻璃和塑料制品

在许多实验室，塑料制品（聚丙烯、聚乙烯、含氟聚合物）已经或正快速

地替代玻璃制品。除了价格便宜以外，塑料制品具有质量轻、耐用、化学惰性、可灭菌等优点。根据需求，也能具有类似玻璃的透明度。塑料制品的一大缺点是不能在电炉或者火焰上直接加热。容器的最大容量一般都印刷在其表面上。

一次性塑料移液管的使用是合理消费还是过度奢侈，是微生物实验室中争议比较大的话题。起初，一次性移液管比可重复利用的玻璃移液管要便宜很多，但可重复利用玻璃移液管的清洗和灭菌所消耗的费用，可能要高于连续购买使用一次性移液管的费用。一次性移液管在运出厂前已单独包装并进行了灭菌。

微生物实验室中另一种常用的一次性物品是培养皿。虽然玻璃培养皿仍在使用中，但反复清洗和重新灭菌导致其使用成本较高。预灭菌的一次性培养皿可以按个购买，一包聚乙烯培养皿有20个，或者买一箱（通常为500个）。一般的研究工作中，100mm × 15mm 标准的平皿最合适，但更大规格（直径150mm）或者更小规格（直径50mm）的平皿也可以购买到。

酿酒微生物实验室其他常用的玻璃器皿有试管、盖子、固定量程和可变量程的移液管以及用于特殊分析反复所需的玻璃器具。因为酿酒微生物实验室一般不涉及病原微生物，所以清洗和重复利用试管所面临的危险最多只会是操作中的玻璃破损。

固定容量和可调节量程的移液器在微生物实验室大多用于溶液的稀释和小体积（ μL ）试剂的吸取。一般固定容量移液器用于常规稀释，可调节量程的移液器用于需要微量溶液转移的酶学分析。最后，对于特殊应用的玻璃器皿，如用于挥发酸度分析的蒸馏器， SO_2 通气氧化设备以及玻璃蒸馏器等在日常实验中都是不可缺少的。

18.8 培养基

第13章中所提到的多数实验室研究所需要的基础琼脂培养基，现在都可以在生物试剂公司直接购买。与其配制大量的培养基作为常规基础之用，使用单独的试剂制备培养基更为有效。但是多数小酒厂可能希望购买预先配制好的培养基，这样在灭菌和倒平板之前仅需要很少的准备工作。

根据微生物喜好的不同，预先包装好的培养基试剂盒也可以购买到。试剂盒包括灭过菌的培养皿、0.45 μm 格栅膜，装有吸附剂饱和膜的支持垫片（或者垫片配套装在安瓿中的培养基）。研发这种试剂盒，最初是为了能在取样点直接进行分析，而不需要采集样品返回实验室后再分析。虽然试剂盒比较贵，但对于酿酒厂，分析样品的频率较低，所以这套方法比较可行，每年的分析费并不高。

18.9 光度计

分光光度法和浊度分析法不仅可用于测量可溶物质的吸光度和透光率，还

可以用来估算悬浮液中微生物或颗粒物的密度。在微生物实验室中，分光光度计最常用于酶学分析（如苹果酸和乳酸），而浊度计往往用于定量样品的浑浊程度。分光光度计和浊度计的工作原理都是基于光线和可溶性物质或颗粒之间的相互作用（见 14.7）。

18.10 层流净化罩

一般情况下，酿酒实验室内充斥着高密度的微生物，有的是与酿酒过程相关的，有的是直接通过窗户或通风系统带进的空气中的微生物。一个不常见，但很有趣很麻烦的事情是空气中的螨虫可以防止培养皿的污染，因为它们在微生物菌落上来回穿梭进行觅食。

层流无菌空气过滤器可向工作区域不断地提供“干净”的空气，以达到无菌的要求。室内空气需依次经过预过滤器和无菌高效微粒过滤器（HEPA），最终以恒定速率流向工作区（见图 18.2）。装备良好的层流净化安全柜一般都比较昂贵（>8000 美元），对于酿酒厂微生物实验室来说并不是很经济合算。但装有高效空气微粒过滤器的桌面工作台可以作为替代品使用，同时价格也比较合理，仅需 3000 美元左右。

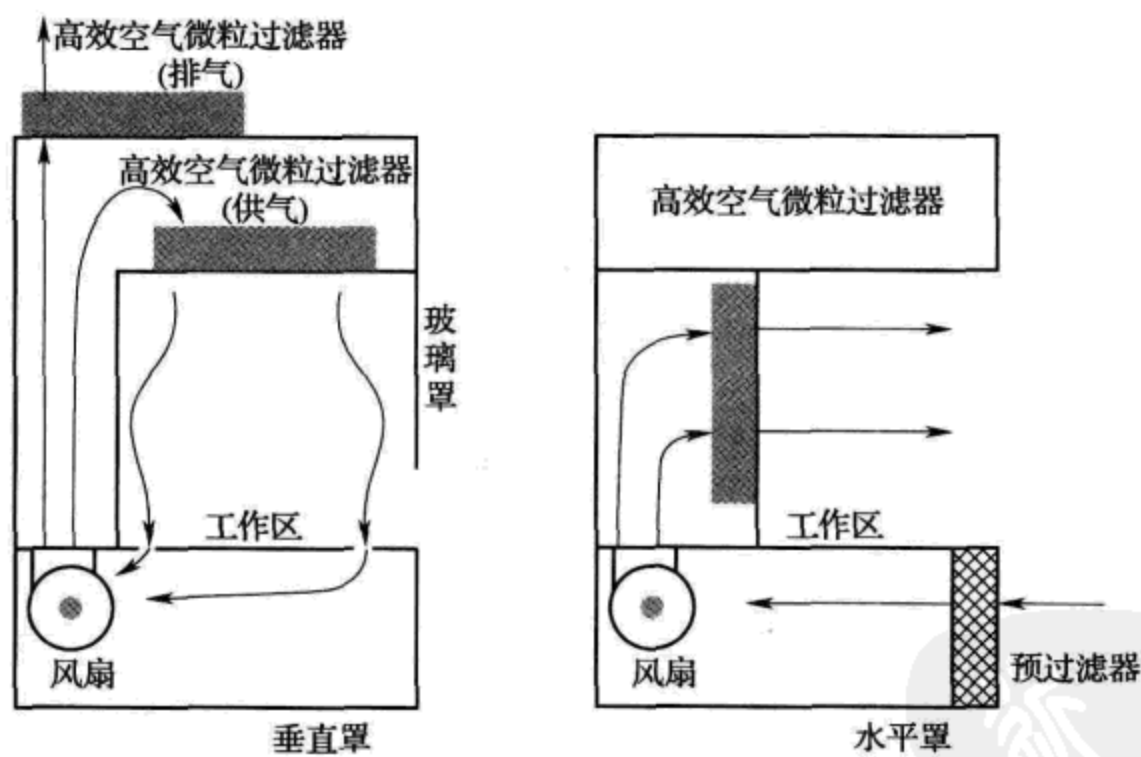


图 18.2 垂直和水平层流净化罩的气流

18.11 其他方面

用于配制试剂的水源是酿酒实验室的一个重要基础元素。由于含有不同浓度的氯离子和矿物质，自来水不能够用于配制试剂或清洗玻璃器皿，最好使用

纯化后的水。利用小型蒸馏器制备实验用蒸馏水，可以满足多数实验室的需求。其他设备也可以制备去离子水，其中有些是基于反渗透原理。根据出水量和水源的质量，设备的价格差异也比较大。

通常情况下，溶液或者培养基灭菌前都需要加热。因为电炉不产生明火，是常用的加热装置。在实验室中，电炉和搅拌器通常联用，这是由于需要同时使用加热和搅拌两种功能。

大型微生物实验室中很实用的另一个设备是旋转接种仪（Swanson 等，1992）。简单地说，就是一定体积的果汁或葡萄酒按阿基米德螺旋轨迹被自动分配到旋转的琼脂平皿上。因为随着触针不断偏离平板中心，加入的样品量不断减少，平板上特定的区域就能进行菌落计数，据此可以推导出起始样品中的微生物数量。虽然仪器的购置费用比较昂贵，但这些设备可以节省大量的培养基和工作时间。

在微生物实验室比较有用的其他设备包括泵、接种环、天平、火源等。小的蠕动泵一般用于制备 9mL 倍数的稀释空白液，而不需要手动转移溶液（见 14.3）。厂家提供的许多蠕动泵，型号不同，价格也不同。接种环用于微生物的转移。尽管预灭菌的一次性接种环也可以使用，但用镍铬合金或铂金制作的金属接种环应用更广，因为它可以重复燃烧、重复使用。托盘天平一般具有 ± 0.1 g 的精确度，可以满足配制培养基的要求。最后，煤气灯在无菌操作中具有重要作用，它可以燃烧天然气或酒精。使用酒精时若翻倒，很容易产生严重的伤害或火灾。一些比较新的天然气灯具有指示灯，可以减少天然气的消耗。



第 19 章 实验室安全

19.1 引言

现在工作场所的安全问题已引起广泛关注，并上升到法律层面。管理人员若不能使工人在安全的环境中工作或再三忽视工人所关心的事宜，必将会受到刑法和民法的惩罚。尽管有法律约束，但适当的工作环境和合适的安全健康措施，可保证工作的顺利开展。

微生物实验室的工作人员不仅与化学实验室工作人员一样，需要关注共同的安全问题，而且还会面对一些本身工作所独有的安全挑战。这包括暴露于存在上亿个潜在病原微生物环境中的可能性、高压灭菌设备及无菌操作中明火的使用、培养基中剧毒化学成分的使用（如放线菌酮、DMDC 等）。

19.2 伤害和疾病预防措施

像其他工作场所一样，积极的管理措施是建立和维护一个安全的工作环境最关键最重要的组成部分。创建伤病预防计划（IIPP）是建立一个可行的安全项目的第一步。该文件确定酿酒厂开展和维护该计划，并更新保证工人工作时安全和健康的政策和程序。伤病预防计划必须在酿酒厂存档，且能够随时被抽检。一般情况下，文件是由管理者和工作人员推选组成安全委员会来一起制定的。伤病预防计划应被视为工作文件，当发现潜在危险必须进行及时的修改。

伤病预防计划的关键内容为有效的培训计划、信息交流、安全设备及系统的安装，如眼睛清洗、安全淋浴、火灾警报器及灭火装置、急救箱和个人防护装备。

19.2.1 培训

不管处于何种职位，每个职员都有合法权益，知道自己工作具有的潜在安全和健康问题。所以监督人和安全管理者需要开展常规的安全训练。所有职员应该接受培训，熟悉灭火器和个人防护装备的使用，防止背部损伤、滑倒、摔伤等意外伤害。另外，有些职员根据工作性质，还需进行额外的培训。此类培训包括旗语和管制、铲车和机动车辆的操作、危险化学品接触。此外，破碎机、

清洗机、除梗机、压榨机、泵、其他设备、呼吸保护器、梯子、焊接设备的安全维护，特定场所及高空作业，也是优先培训的内容。每位员工档案中都必须有一份安全培训记录，以便记录员工接受的各种特殊培训（见图 19.1）。

职员姓名	聘用日期	培训日期
职位		
检查 1: () 新职员 () 转岗 () 重新雇佣 () 兼职		
<div>讨论的检查条目</div> <div>() 1. 培训目的</div> <div>() 2. 立即向管理人员汇报事故</div> <div>() 3. 急救<div>a. 接受治疗</div><div>b. 应急设备（急救箱、洗眼水）的位置和使用</div><div>c. 经过培训的急救职员所处的位置和姓名</div></div> <div>() 4. 工作中潜在的危害<div>a. 危害的识别和安全维护程序</div><div>b. 必需的个人防护设备的使用和维护</div></div> <div>() 5. 紧急事件<div>a. 出口位置和疏散路线</div><div>b. 火灾警报器和灭火器的位置和操作</div><div>c. 医学、化学和火灾等事件的特殊程序</div></div> <div>() 6. 疾病和伤害预防措施<div>a. 安全委员会功能和代表的姓名</div><div>b. 安全政策法规的重要性</div></div> <div>() 7. 个人工作习惯<div>a. 正确的起重技术和防止滑倒摔伤</div><div>b. 良好的实验室管理和抽烟规则</div><div>c. 安全工作程序</div></div> <div>() 8. 职位需求的特殊培训<div>a. _____</div><div>b. _____</div></div> <div>我已经按照程序清单对职员进行了培训</div> <div>日期_____ 检查人_____</div> <div>我已经接受了安全程序清单上的培训</div> <div>日期_____ 职员_____</div>		

图 19.1 安全培训记录示例

19.2.2 信息

所有实验室工作人员都有权查看相关的文件信息，以了解工作中可能接触的各种化学药品或溶液的物化特性及对健康的影响。满足职员知情权所需提供

的信息可查阅化学品安全技术说明书（MSDS）。运往美国的所有化学药品都必须具备这些文件。当出现意外接触时，MSDS 配备紧急响应部门和毒品控制中心，提供病人救治信息。并不是明显有毒性的化合物才需要 MSDS。如葡萄糖、酒石酸和蒸馏水等似乎安全的物质也需要自己的 MSDS。

由于安全管理需要，实验室工作人员必须在任何时间都能很容易地获取 MSDS，大多数实验室将这些文件放置在易确认的三孔活页夹中，并按文件字母排序。推荐使用嫩黄色的装订，因为该颜色比较容易识别。准备足够数量的复印件，放在每个实验室或工作区。也可以在不同网站上找到 MSDS 文件。

19.2.3 交流

很多事故都可以通过交流而避免产生或减少其损失。比如安全委员会的成立可以促进工作人员和管理人员讨论和确定安全政策和程序，并将其纳入 IIPP。安全委员会也可建立工作人员识别安全隐患的机制，从而减少事故的发生。

因为事故发生后必须立即向管理人员汇报，所以实验室必须张贴紧急电话号码的名单。尽管常规的事故报告单也可以使用（见图 19.2），但酒厂最好建立自己的安全事故报告表及管理者使用的事故调查单。表格内容应该包括受伤者及见证人的姓名和联系方式、事故发生时间、地点、事件经过、所涉及的部门及联系人和联系方式。

职员姓名	事故日期
管理员姓名	调查日期
检查事件所有因素： <div><input type="checkbox"/> 人为 <input type="checkbox"/> 设备/工具</div> <div><input type="checkbox"/> 时间因素 <input type="checkbox"/> 制度/程序</div> <div><input type="checkbox"/> 场地条件 <input type="checkbox"/> 职业照射</div>	
以下空白处解释事故发生原因（如果需要可以在其他空白处附加表格）	
列出建议整改措施（如果需要可以在其他空白处附加表格）	
实际所实施整改措施及完成时间	
管理员签名：	日期
职员签名：	日期

图 19.2 管理员事故调查报告实例

危险警告标志的张贴也是一种交流的方式。实验室内警告用标志或布告提醒工作人员关注安全和健康，并在事故发生时能及时做出反应。

19.2.4 眼睛清洗和安全淋浴处

尽管职员在工作时应一直佩戴保护性眼罩，但有时溅在脸上的液体有可能流入眼中。洗眼处就是为了在实验室内清洗进入眼中的化学物质而设计的区域。淋浴处是清洗事故发生时接触到身体上的刺激性物质的区域。大多数洗眼和淋浴处能在特殊时段供应一定量的水。皮肤和眼睛接触化学刺激都是与实验室事故相关的，所以有时洗眼处和安全淋浴处被组合成一个独立的单元。如果单独建立，则两者应该彼此相邻。

洗眼处应在距离实验室工作区域15m以内。因为一旦发生事故，伤者的视力可能会减弱，所以洗眼处前方不能有任何障碍物。与其他安全设备一样，洗眼处和淋浴处应该定期进行检查，并需制作检修卡。检修卡上应有检修人员签名和检修日期。

19.2.5 火灾警报器和预防措施

火灾警报器和室内顶部的喷水装置应该经常检修，以保证其正常工作。喷水装置与储存物之间的距离应至少相距18ft (5.5m)。装饰品（可运动物品或艺术品）不能悬挂在喷水装置的喷嘴处。

所有实验室都应配备灭火器，并安装在易被发现的靠近出口的墙壁上。由于对多种类型的火灾均有很好的灭火作用，所以多功能型灭火器（ABC型）得到了广泛应用。灭火器应该至少一年检修一次。除了灭火器以外，沙子和其他吸附剂使用快速简易，获得方便，适用于熄灭小型火势。

19.2.6 急救

急救培训对所有的工作人员都是必需的，当涉及安全事故时它显得更为重要。每年工作人员都应获得温习急救相关培训的实践机会。参加这些培训和相关安全会议的情况，都应该记录进职员的个人档案。

每个实验室都应该具有急救箱，箱中应包括各种伤害急救的物品。急救箱的大小和里面物品的数量应该取决于实验室常规工作人员的情况。一般情况下，急救箱内应有黏性绷带、绷带敷布、剪刀、镊子、三角绷带、杀菌皂、无菌衬垫、滚筒纱布、乳胶手套、心肺复苏面罩。其他的还包括眼部敷剂、胶带、化学冰袋、蜜蜂刺伤药签、关节和手指绷带、一次性温度计、洗眼生理盐水。急救箱内物品应该定期清点补充。口服药物不应该放在急救箱中，以防止药物滥用及意外药物反应。

19.2.7 个人防护装备

具有潜在危险的工作场所必须具备相应的个人防护装备（PPE）。个人防护装备可以保护工作人员避免被烧伤、呼吸损伤、擦伤、空气传播的危害、刺伤或其他伤害。大多数情况下，这些设备包括手套、护眼罩、实验服、保护性鞋子等（见表 19.1）。工作人员都应该接受培训，以了解各种设备的用途及正确的使用方法。损坏的个人防护装备不能被使用。

表 19.1 不同危险因素所需的最低限度个人防护设备

危险因素	身体部位		
	眼睛	脸部	身体/手
实验室常用化学试剂	安全眼镜		普通工作服（不应是露趾鞋或短裤），更好的服装（实验服），根据情况佩戴手套
腐蚀性化学试剂、强氧化剂、致癌或突变剂	安全眼镜，化学防溅护目镜	护脸罩	适当的防护手套、围裙和配套的服装。视化学物质体积，可能需要全身防护衣
锋利物品、玻璃，玻璃插入塞子的过程	安全眼镜		厚重织物或皮革手套
极限温度（尤其是热或冷的液体或物质）	安全眼镜，化学防溅护目镜	护脸罩	对高于 100℃ 或低于 -1℃ 的隔热手套

最重要的个人防护装备可能是保护性护目镜。药物或比较松弛的护目镜仅能在化学药品飞溅时提供有限的保护。当撞击和液体飞溅事故发生时，佩戴舒适的护眼罩可以提供有效的保护，所以在实验室内应用更加广泛。

实验室内合适的着装也能够减少皮肤接触危害的发生。经常在实验室工作的人员必须拥有合适的实验服装。长袖实验服可以防止前臂被液体飞溅到，所以不要将长袖卷起。同样，工作人员也不能穿露脚趾的鞋或凉鞋在实验室工作。酿酒厂中经常接触化学消毒剂的工作人员除了带护眼罩和手套外，还应该穿着防水围裙和长靴。

一次性乳胶或腈质手套可以用来护手。保护性手套应该质轻、便宜，并能够有一定的触感和灵巧性。因为这些手套只具有有限的化学抵抗力，所以这些手套只能用于防护瞬间的飞溅液体。对于那些对滑石粉敏感的人员，也可以购买没有增滑剂的乳胶手套。

可能呼吸器不太被人接受，但它是一种安全保护设备。尽管防尘面具可以帮助工作人员阻挡很多空气中携带的颗粒物，但它对挥发性化学物质的作用却微不足道。只有经过培训并取得相关资格的人员才可以使用呼吸器，而且只有在特殊情况以及其他控制空气污染的所有措施都执行后才能使用。实验室内排气扇和通风橱是排除挥发性有害物质的第一道防线。由于呼吸器的使用本身可

能对人体健康造成一定的危害，所以使用人员必须经过适当的培训和认证，且需要小心地佩戴至使用者的脸部。

19.3 安全示例

任何安全程序的基础之一就是“良好的内务管理”。一般认为，组织管理良好的工作场合很少发生安全事故。当仪器、设备、玻璃器皿、其他试剂、化学药品和培养基暂时不使用时，应该存放在合适的位置。不允许工作台上堆积杂物，同时化学物质应该储存在专门的储存柜内。有缺口或坏掉的玻璃器皿应该丢弃到专门的容器内。大多数破碎的玻璃可以回收利用，但硼硅酸盐玻璃需要当作实验废弃物处理。

19.3.1 生物危害和化学废弃物

遵守生物危害物质和化学废弃物管理条例是所有实验室最重要的事宜之一。不管是储存的还是使用过的试剂，化学废弃物绝不能直接倒入实验室排水槽中，而是应该收集到适当的、标有“有害废物”的容器中，然后由废物管理机构进行处理。化学药品和反应物绝不能进行混合，因为这样不仅可能会产生实际的危险，而且在处理废物时会增加额外的成本。

使用过的一次性培养皿、塑料容器和枪头必须储存到被认可的灭菌袋中（生物危害性）并和培养物一起灭菌后，才能丢弃。所有可能引起刺伤的皮下注射器、塑料或玻璃滴管、刀片等都应该放在有包装的器皿中，并标识“锋利”。

含有少量活性微生物培养液的破碎容器应该使用浸有实验室消毒液的纸巾进行包裹。若有破碎的玻璃需要清理，可以使用实验室刷子或簸箕收集后转移到垃圾袋中。大量的液体培养物需要先进行消毒，然后再用拖把清理。使用过的拖把和水桶最好在消毒液中浸泡几个小时。

19.3.2 电源

用电事故是实验室内最常遇到的危险事宜之一。尽管在大多数工作场所能经常见到多孔插座，但不要使用没有安装内部断路开关的插座。总工作电流不能超过插座上标识的最大安培数（一般为15A）。断路开关周围的区域为维修人员的工作区，应该保持其清洁干净。大多数情况下，粘贴在门上的卡片可用来提醒人员，电路盒的周围需要保持清洁。

有时会将线路延长使用，但仅为暂时之需。如果仪器正常运作（如水浴锅、恒温箱），应用直接配线代替延长线路。这些线路操作应该由专业电工来完成。仪器上旧的或磨损的电线应该被替换。

19.3.3 热和蒸汽

大多数实验室都有用热或蒸汽来对培养基或其他用品进行灭菌的相关设备。这包括热水浴、烘箱、灭菌锅（见第 18 章）。经常使用产生热水、蒸汽的相关设备，可能会引发烧伤等主要的安全事故。常规高压灭菌锅的特殊安全事项已经在第 13 章进行了讲述，更多的使用信息可以在制造商产品使用说明书上获得。

19.3.4 机械的防护措施

尽管机器设计时已经考虑到安全因素，但涉及旋转部件（连接杆等）、剪切运动、皮带、滚筒、齿轮、运动汽缸等机械工作区域都需进行适当的防护。为减少事故，必须在设备附近进行控制。此外，操作员必须在不离开仪器操作区就可以切断电源。

19.3.5 储存

化学药品或仪器的不当储存会引发严重的安全隐患。例如实验室所用的高压气瓶如果没有适当的瓶帽或没有利用墙壁或实验台夹住，则有可能会成为“导弹”。在存放气瓶时，必须一直用链条或夹子将瓶帽固定在合适的位置。另外，储存在一起的化学药品应保证相互兼容，以减少交叉反应的几率（如酸和碱不能储存在一起）。

易燃物质不能储存于家用冰箱中，而是应该存放在特定的橱柜中。这些橱柜能够排放蒸汽，且具有防爆作用。只有具有防爆功能的冰箱或储存间才可用于储存某些需要冷冻储存的易燃物质。这些单元都应有封闭的电路系统，以减少火花的产生。为减少失误，所有冰箱都应明确标明其储存用途。

在实验室内不能食用食品或饮料，包括咖啡壶和软饮料等在内的相关食用物品也不能储存于实验室冰箱内。应在冰箱上张贴醒目的标志。为实现此目的，应给实验室工作人员提供附带有冰箱和微波炉的独立休息区。

19.3.6 紫外线

在微生物实验室中使用紫外线已经有了悠久的历史，它最初的用途是作为杀菌灯的能源。高能量射线（180 ~ 250nm）会使细胞 DNA 发生不可逆的变化，从而导致细胞死亡。在生物安全橱柜或层流净化罩中使用紫外灯，杀死微生物，对环境空气灭菌。

由于紫外灯能产生有害的辐射，工作人员应避免身体未保护部分直接暴露于辐射区域。辐射反应的严重程度取决于身体暴露的时间和受影响的身体部位。手、臂和脸可能只是简单地晒黑，但眼睛受到辐射可能引起不可逆的损伤，长

时间地受到辐射可能会导致皮肤癌。紫外线的过度直接接触并不会立即引起明显的反应，但在个体出现效应前，损伤已经产生。所以实验室安全培训教育对减少工作人员安全与健康危险事故的发生具有重大意义。

工作人员在紫外线下操作时应穿着实验服等防护服装和戴着手套，以减少皮肤的直接接触。常规眼镜或隐形眼镜仅能提供有限的保护，最好的保护措施是佩戴面罩。紫外工作区应该张贴警告标志。

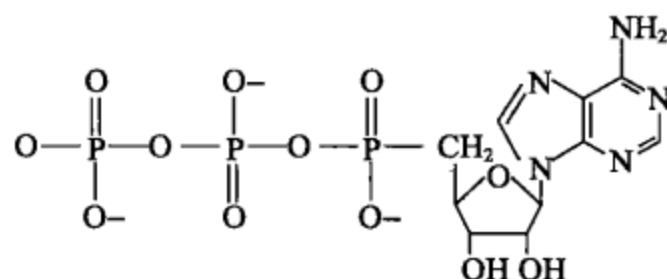


术 语 表

吸收 (Adsorption): 化学物质从接触点穿过生物屏障的运动过程。

主动运输 (Active transport): 化合物逆浓度梯度跨膜运输的耗能过程。

三磷酸腺苷 (ATP): 一种高能化合物, 是细胞共同的能量来源。



需氧微生物 (Aerobe): 微生物的生长必须有空气 (氧气) 的存在, 如醋酸菌属微生物。

有氧呼吸 (Aerobic respiration): 葡萄糖被氧化为 CO_2 、水和高能分子 ATP 的一系列连续的生物化学过程 (糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化)。

琼脂 (Agar): 一种从海藻中提取的复杂碳水化合物, 可用于配制半固体培养基。凝固后的琼脂具有类似于凝胶的质地, 在 $40 \sim 45^\circ\text{C}$ 范围内凝固, 加热到沸腾后才能熔解。大部分液体培养基可以添加 $15 \sim 20\text{g/L}$ 的琼脂来固化。

氨基酸 (Amino acid): 一类含有羧基 (COOH) 和氨基 (NH_2) 的有机化合物。氨基酸是蛋白质和酶类的基本结构单位。

厌氧微生物 (Anaerobe): 在无氧条件下才能生长或者生长更好的微生物。许多乳酸菌是兼性厌氧微生物, 在无氧条件下生长良好, 而且在少量氧存在时也可以生长。

厌氧罐 (Anaerobic jars): 由于设备成本, 大部分实验室没有厌氧培养箱, 装有 CO_2 发生装置的塑料罐是个很好的替代品。另外, 有些酿酒师使用蜡烛罐, 在密封前在罐内点燃蜡烛, 火焰熄灭前可耗尽氧气。

无性型 (Anamorph): 酵母的无性繁殖形态。尽管无性型和有性型是同种微生物, 但是它们之间的区别在于无性型不能产生孢子, 而有性型可以产生孢子。微生物学家通过酵母生成孢子的能力对属和一些种的微生物进行命名。

子囊孢子 (Ascospores): 许多酵母生成的有性孢子, 作为繁殖的一种手段。

子囊 (Ascus): 许多酵母生成的一种结构, 内部含有子囊孢子。

无菌操作 (Aseptic technique): 预防微生物污染所采取的任何技术或者程序。一旦培养基或者仪器灭菌后, 通过无菌操作可以保持无菌状态。

高压灭菌锅 (Autoclave): 通过蒸汽可以使温度超过 100°C 的压力容器, 通常用来对培养基和仪器进行灭菌。

自养生物 (Autotroph): 通过生化反应从无机物合成自身所需有机物的微生物。

杀菌剂 (Bactericidal): 对细菌具有致命效应的化学物质。

噬菌体 (Bacteriophage): 可以感染细菌的病毒, 噬菌体感染特定的宿主细菌, 并且能杀死细菌。

抑菌剂 (Bacteriostatic): 可以抑制细菌但不具有致死效应的化学物质。

生物危害 (Biohazard): 生物制品或具有感染性的材料, 如微生物病原菌 (沙门菌)。

白利糖度 ($^{\circ}\text{Brix}$): 表示可溶性固形物主要是糖类浓度的单位, 以质量/质量的形式来表示 (g 葡萄糖/100g 液体)。

布朗运动 (Brownian motion): 在油镜下观察湿片时所看到的微生物随机运动。

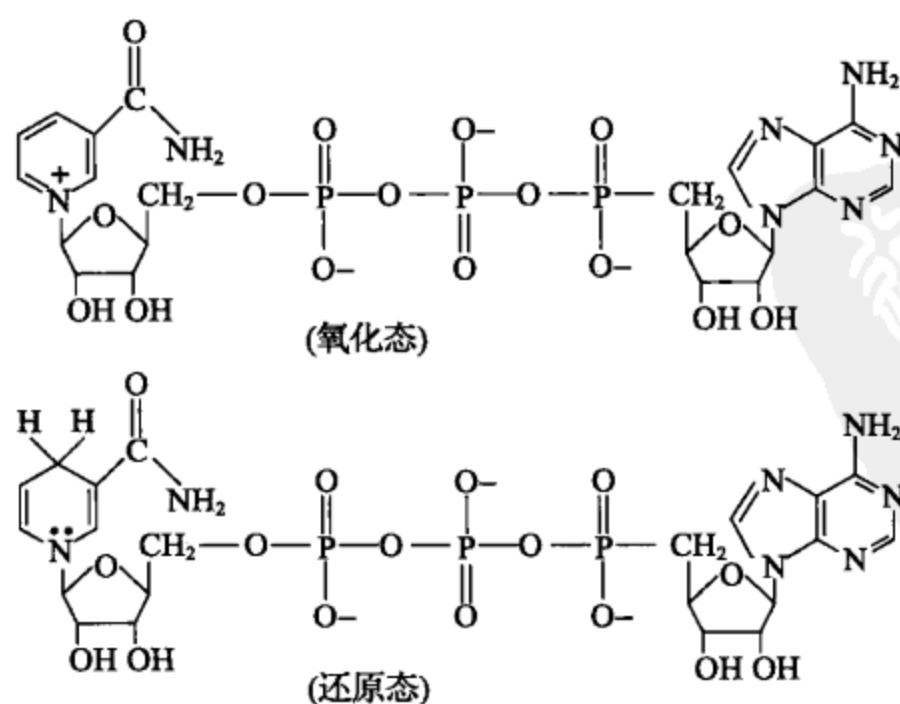
芽殖 (Budding): 酵母的无性繁殖形式, 通过出芽形成子细胞并从母细胞上脱落。酵母可以进行两端芽殖 (在细胞两端出芽) 或多边芽殖 (在细胞表面所有部位出芽)。

致癌物质 (Carcinogen): 可以使动物或人类癌变的化学或物理因素。

化学相容性 (Chemical compatibility): 不同试剂具有相互反应的潜力, 因此必须要考虑安全问题。一些化学物质不能与反应活性物质相邻保存 (酸和碱)。

球菌 (Cocci): 在显微镜下呈球形或近似椭圆形的细胞。

辅酶 (Coenzyme): 可以转移或者接受电子来辅助酶催化反应的化合物。如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可以氧化态存在 (NAD^+) 或者接受一个电子以还原态存在 ($\text{NADH} + \text{H}^+$)。



菌落 (Colonies): 一个活细胞在固体琼脂培养基表面上繁殖形成的细胞群体, 可用于计数。根据微生物形态, 菌落可能是由成对、成链或成团的细胞繁

殖形成。在这种情况下，微生物的数量应该采用菌落形成单位（CFU/mL）而不是细胞/mL。

污染（Contamination）：进入体系中的原料、化学物质或者微生物降低产品质量或者带来安全隐患。

腐蚀物（Corrosive）：通过接触可以对人类造成可见损坏的物质。

稀释空白液（Dilution blank）：用于稀释含有大量活菌体样品的经过灭菌的1g/L蛋白胨溶液。样品在涂布固体琼脂前，进行一系列梯度稀释（1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000）。

德拉姆管（Durham tube）：倒置于液体肉汤培养基中监测CO₂生成量的一种小试管（9.5mm×50mm）。

生态学（Ecology）：研究微生物和环境之间相互关系的学科。

酶（Enzyme）：可以促进其他分子变化但自身不发生任何变化的蛋白质催化剂。例如，催化H₂O₂生成水和O₂的过氧化氢酶。酶的命名中通常带有“ase”作为后缀（例如过氧化氢酶catalase，果胶酶pectinase）。

真核微生物（Eukaryote）：含有细胞核和细胞器的真核细胞构成的微生物，如酵母。

需复杂营养的菌（Fastidious）：该类微生物需要多种营养成分，但自身不能合成，必须外界提供。

发酵（Fermentation）：在厌氧条件下分解糖等有机物质生成其他产物的过程。

属（Genus）：微生物的分类单位，通常包含许多种。属是微生物分类学中双名法的第一个单词。

糖酵解（Glycolysis）：厌氧条件下分解葡萄糖生成丙酮酸或者乳酸和ATP的过程。

革兰染色（Gram stain）：根据细胞对特殊染料结晶紫的保持能力对微生物进行分类的鉴别染色法，可分成革兰阳性菌和革兰阴性菌。在显微镜下革兰阳性菌呈现紫色，而革兰阴性菌呈现红色。

单倍体（Haploid）：仅具有一套染色体的细胞，而双倍体细胞内有两套染色体。

危害（Hazard）：任何可以造成伤害或者死亡的物理、化学或者生物材料等，如易燃、易腐蚀的化学药品或者生化试剂。

异宗结合（Heterothallic）：单个菌株自身不孕，必须与另一菌株相对应的性器官配合才能完成有性交配。同宗结合微生物同一个体内含有2种性器官。

己糖（Hexose）：六碳糖，在葡萄醪中葡萄糖和果糖是最常见的己糖。

玻璃棒（Hockey stick）：一种弯曲成“L”形的玻璃棒，通常用来在固体培

培养基表面进行均匀涂布。

菌丝 (Hyphae): 由许多酵母或者霉菌形成的丝状或线状结构, 最后形成菌膜 (菌丝体)。

接种 (Inoculum): 为培养细胞, 将少量活的微生物转移到培养基或者汁液中。

三羧酸循环 (Krebs cycle): 又称为柠檬酸循环, 通过一系列有氧反应, 将糖酵解途径生成的丙酮酸转变成能量 (如 ATP、还原态 NADH 和 FADH_2)、 CO_2 和水。

接种环 (Loop): 带有一个手柄且末端处有一个金属环的装置, 用来转移微生物, 又可称为转接环, 通过将金属环在火焰上灼烧来灭菌。

化学品安全技术说明书 (Material Safety Data Sheets, MSDS): 根据生产商和经销商提供的化学试剂的危险性、物理特性和暴露时的急救措施等信息所印制的材料。

培养基 (Medium): 不同微生物生长所需各种成分组成的配方。这些成分包括葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、肝浸膏等, 培养基有液体培养基和固体培养基两类, 固体培养基是通过添加琼脂实现的。

亚甲基蓝 (Methylene blue): 添加到上清液来估计酵母生存能力的鉴别染料。活的酵母会还原染料生成无色物质, 而在显微镜下死亡的酵母呈蓝色或者黑色。

微生物 (Microorganism): 只能借助显微镜才能看到的微小生物。虽然在显微镜下大部分微生物以单细胞形式存在, 但有些微生物的多个细胞成对或呈链排列。

稀释瓶 (Milk dilution bottle): 通常用来进行大量稀释空白的四方瓶, 总容量可达 160mL, 但通常只装 99mL, 许多产品都在瓶身上标有 (99 ± 1) mL 的刻度线。

霉菌 (Mold): 具有丝状结构的真菌。

菌丝体 (Mycelium): 真菌的菌丝交错形成的结构。

NAD^+/NADH : 见“辅酶”。

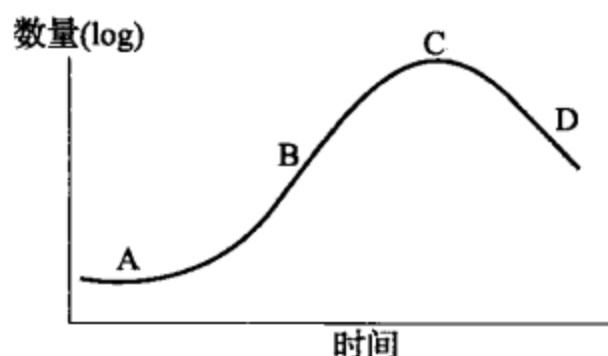
针 (Needle): 在木制手柄上固定一针状结构, 制成接种针, 可在明火上重复灭菌。

戊糖 (Pentose): 五碳糖, 如树胶醛糖、核糖, 一般在葡萄糖中的浓度很低, 小于 0.05%。

个人保护装置 (Personal protective equipment, PPE): 工人用来降低或排除接触危险材料或者环境的潜在性所用的装置, 包括护目镜、保护性手套等。

培养皿 (Petri plates or dishes): 无菌的带有盖子的玻璃或者塑料盘, 一般用于装有凝固的介质。

生长期（Growth phase）：微生物在葡萄汁、葡萄酒或者培养基中生长可分为4个明显的阶段：（A）延滞期，（B）对数生长期，（C）稳定期和（D）衰亡期。在延滞期（A），细胞逐步适应新的环境，并且细胞体积变大（但数目不变）。在对数期（B），细胞数目快速增长，到达某一点后，生长速率下降，细胞进入稳定期（C），此时细胞的生长和死亡速率达到平衡，最后有害废物的积累和可利用营养物质的降低导致细胞的死亡（D）。



相差显微镜（Phase - contrast microscope）：与对培养物进行染色来观察的明视野显微镜不同，相差显微镜可以对液体培养物直接进行观察。光线通过密度较高的介质（微生物细胞）时，光程会比通过其他介质（液体）的光线滞后。相差显微镜提高了两种介质（细胞和液体）之间折光率的差异。

倾倒平板（Pour plates）：在无菌的条件下将液体样品转移到一个培养皿中，并向其添加冷却的琼脂培养基（仍为液态）。在琼脂培养基固化之前，培养基和液体样品必须混合均匀。

原核生物（Prokaryote）：细胞内缺少真正的细胞核和其他细胞器的微生物，如细菌。

假菌丝（Pseudohyphae）：酵母出芽形成的拉长的丝状结构，类似菌丝。与真菌丝相比，假菌丝上存在缩痕。

假菌丝体（Pseudohyphae）：假菌丝形成的集合体。

氧化还原作用（Redox）：是氧化作用/还原作用（reduction/oxidation）的缩写，指一种物质被氧化（失去电子）和另一种物质被还原（得到电子）同时进行的反应。

残留物（Residual）：指在清洗或消毒后残留在仪器或者地板表面的化学物质。

棒状（Rod）：指在显微镜下呈矩形的细胞，两边平行且比其他两边要长。

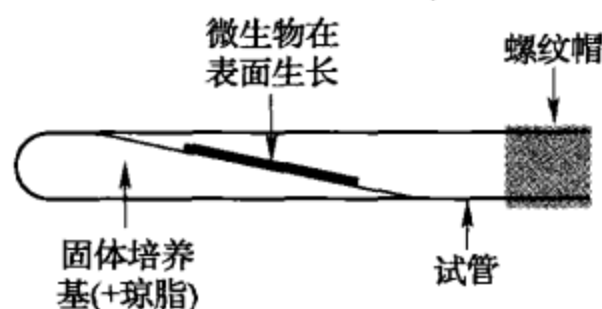
抑菌（Sanitation）：降低葡萄酒厂中微生物的数量，尽量保持较低的水平，而灭菌是指杀死所有的微生物。

次级防渗漏系统（Secondary containment）：当主容器破裂后可减少额外渗漏或溢出的方法，例如装废液的瓶子外的夹套。

选择试剂（Selective agent）：加入培养基中可以抑制不需要的微生物的生长，而不影响目的菌种生长的化学物质。

浆液 (Serum): 上清液, 离心后除掉固体后的液体 (如番茄汁)。

斜面培养 (Slant): 在无菌条件下将含有琼脂的液体培养基倒入一试管中, 冷却和凝固琼脂时将试管在桌面上呈一定角度放置。斜面常用来长期保存酵母和细菌。

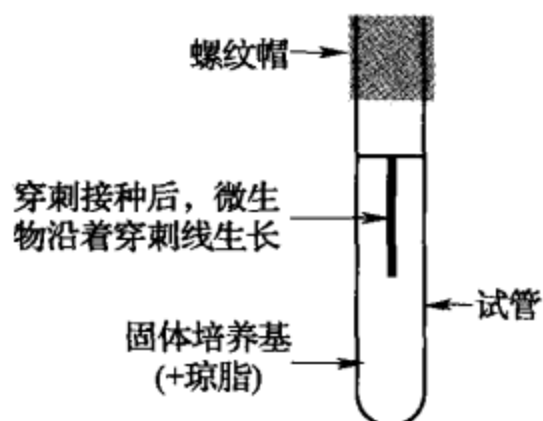


变种 (sp. or spp.): 通常在种名的后面, 表示一个或者更多未确定的种。

孢子 (Spore): 一些微生物为了抵抗高温等胁迫因素而形成的没有繁殖力的结构, 当外部条件适合生长时, 孢子可以形成具有活力的微生物个体。

涂布平板 (Spread plates): 指在无菌条件下将样品转移到已经凝固的介质表面 (形成凝胶状)。样品量通常为 0.1 mL, 最后用玻棒将样品在介质表面涂布均匀。

穿刺培养 (Stab): 与斜面培养相似, 用于长期保存微生物, 特别是不需要氧气的微生物。



菌株 (Strain): 很多生化、物理和基因特性相同的微生物被归类为同一种, 但是在某些特性上具有次要但一致的差异。这些特性包括 (并非必须的) 可以发酵某种特定的糖、对 pH 的忍耐力等。

有性型 (Teleomorph): 能进行有性繁殖或者形成孢子的酵母 (见无性型)。

保温 (Temper): 在倾倒平板之前, 含有琼脂的培养基需要进行调节温度, 大部分微生物研究者将高压灭菌后的培养基在 45 ~ 50℃ 的水浴中放置 1h。

太多无法计数 (Too - Numerous - To - Count, TNTC): 在倾注或涂布平板上计算菌落数时, 菌落总数必须在 25 ~ 250, 如果高于 250, 此时平板上的菌落太多无法计数, 需要分析更高稀释倍数的平板。

损耗量 (Ullage): 木桶中葡萄酒表面上的空间, 当葡萄酒在木桶中陈酿时, 由于乙醇和水分的蒸发损失, 损耗量会越来越大。

存活但无法培养 (Viable - But - Not - Culturable, VBNC): 在常规的培养基

上不能观察到微生物的生长，但其仍保持完整并具有活性的一种生理状态。

振荡器（Vortex, vortexer）：在离心管或者试管中通过产生漩涡快速混合样品的一种特殊装置。

浓度符号（w/w or v/v）：指质量/质量或者体积/体积之比。



参考文献

- ABRUNHOSA, L. , R. R. M. PATERSON, Z. KOZAKIEWICZ, N. LIMA, and A. VENÂNCIO. 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 240 - 242.
- ACREE, T. E. , E. P. SONOFF, and D. F. SPLITTSTOESSER. 1972. Effect of yeast strain and type of sulfur compound on hydrogen sulfide production. *Am. J. Enol. Vitic.* 23: 6 - 9.
- ADAMS, M. R. 1998. Vinegar. In: *Microbiology of Fermented Foods*. B. J. B. Wood (Ed.), 2nd edition, Volume 1, Chapter 1, pp. 1 - 44. Blackie Academic and Professional, London.
- AGENBACH, W. A. 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. In: *Proceedings of the South African Society for Enology and Viticulture*. E. F. Beukman (Ed.), pp. 66 - 88. Stellenbosch, South Africa.
- AGUILAR USCANGA, M. G. , M. - L. DÉLIA, and P. STREHAIANO. 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 157 - 162.
- ALDERCREUTZ, P. 1986. Oxygen supply to immobilized cells. Theoretical calculations and experimental data for oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* with oxygen or *p* - benzoquinone as electron acceptors. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 223 - 232.
- ALEXANDRE, H. and C. CHARPENTIER. 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentations in grape must. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 20: 20 - 27.
- ALEXANDRE, H. , D. HEINTZ, D. CHASSAGNE, M. GUILLOUX - BENATIER, C. CHARPENTIER, and M. FEUILLAT. 2001. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 26: 235 - 240.
- ALEXANDRE, H. , P. J. COSTELLO, F. REMIZE, J. GUZZO, and M. GUILLOUX - BENATIER. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* - *Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 141 - 154.
- ALUR, M. D. 2000. *Botrytis*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. R. K. Robinson, C. A. Batt, and P. D. Patel (Eds.), Volume 1, pp. 279 - 283. Academic Press, New York, NY.
- ÁLVAREZ - RODRÍGUEZ, M. L. , C. BELLOCH, M. VILLA, F. URUBURU, G. LARRIBA, and J. - J. R. COQUE. 2003. Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 220: 49 - 55.
- AMACHI, T. 1975. Chemical structure of a growth factor (TJF) and its physical significance for malo - lactic bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods*. J. G. Carr, C. V. Cutting, and G. C. Whiting (Eds.), pp. 103 - 118. Academic Press, London.
- AMERINE, M. A. and R. E. KUNKEE. 1968. Microbiology of winemaking. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 323 - 358.
- AMERINE, M. A. , H. W. BERG, and W. V. CRUESS. 1972. *The Technology of Winemaking*, 3rd edition. AVI Publishing,

- Westport, CT.
- AN, D. and C. S. OUGH. 1993. Urea excretion and uptake by wine yeasts as affected by various factors. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 35 - 40.
- ANONYMOUS. 1983. *The Merck Index*. M. Windholz (Ed.), 10th edition. Merck and Co., Inc., Rahway, NJ.
- ANONYMOUS. 1984. *Difco Manual*, 10th edition. Difco Laboratories, Detroit, MI.
- ANONYMOUS. 1987. *Velcorin Cold Sterilant Process Information Guide*. Mobsy Corporation, Pittsburgh, PA.
- ANONYMOUS. 2002. *Juice HACCP Training Curriculum*. The Juice HACCP Alliance (P. Slade, chair), National Center for Food Safety and Technology, Illinois Institute of Technology, Chicago, IL.
- ARAGON, P., J. ATTENZA, and M. D. CLIMENT. 1998. Influence of clarification, yeast type, and fermentation temperature on the organic acid and higher alcohols of Malvasia and Muscatel wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 211 - 219.
- ARBETT, R. D., M. ARTHUR, R. DUNN, C. KIM, R. K. SELANDER, and R. GOLDSTEIN. 1990. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Diseases* 161: 230 - 235.
- ARENA, M. E. and M. C. MANCA DE NADRA. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90: 158 - 162.
- ARENDT, E. K. and W. P. HAMMES. 1992. Isolation and characterization of *Leuconostoc oenos* phages from German wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 643 - 646.
- ARRIAGADA - CARRAZANA, J. P., C. SAEZ - NAVARRETE, and E. BORDEU. 2005. Membrane filtration effects on aromatic and phenolic quality of Cabernet Sauvignon wines. *J. Food Engin.* 68: 363 - 368.
- ATLAS, R. M. and R. BARTHA. 1981. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Addison - Wesley Publishing, Reading, MA.
- AUGUSTYN, O. P. H., J. L. F. KOCK, and D. FERREIRA. 1992. Differentiation between yeast species and strains within species by cellular fatty acid analysis 5. A feasible technique? *Sys. Appl. Microbiol.* 15: 105 - 115.
- AXELSSON, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. S. Salminen and A. von Wright (Eds.), pp. 1 - 72. Marcel Dekker Inc., New York, NY.
- AYESTARÁN, B. M., M. C. ANCÍN, A. M. GARCÍA, A. GONZÁLEZ, and J. J. GARRIDO. 1995. Influence of prefermentation clarification on nitrogenous contents of musts and wines. *J. Agric. Food Chem.* 43: 476 - 482.
- BAE, S., G. H. FLEET, and G. M. HEARD. 2004. Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 301 - 312.
- BALDWIN, G. 1993. Treatment and prevention of spoilage films on wines. *Aust. Grape. Wine*. No. 352, pp. 55 - 56.
- BALEIRAS COUTO, M. M., R. G. REIZINHO, and F. L. DUARTE. 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non - *Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 49 - 56.
- BALEIRAS - COUTO, M. M., B. J. HARTOG,

- J. H. H. HUIS INT VELD, H. HOFSTRA, and J. M. B. M. VAN DER VOSSEN. 1996. Identification of spoilage yeasts in a food production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiol.* 13: 59 – 67.
- BARBOUR, E. A. and F. G. PRIEST. 1988. Some effects of *Lactobacillus* contamination in Scotch whisky fermentations. *J. Inst. Brew.* 94: 89 – 92.
- BARTOWSKY, E. J. and P. A. HENSCHKE. 1995. Malolactic fermentation and wine flavour. *Aust. Grape. Wine.* 378: 83 – 94.
- BARTOWSKY, E. J. and P. A. HENSCHKE. 1999. Use of polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic fermentation bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples. *Aust. J. Grape Wine Res.* 5: 39 – 44.
- BARTOWSKY, E. J., I. L. FRANCIS, J. R. BELLON, and P. A. HENSCHKE. 2002. Is buttery aroma perception in wines predictable from the diacetyl concentration? *Aust. J. Grape Wine Res.* 8: 180 – 185.
- BARTOWSKY, E. J., D. XIA, R. L. GIBSON, G. H. FLEET, and P. A. HENSCHKE. 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 307 – 314.
- BARTOWSKY, E. J. and P. A. HENSCHKE. 2004a. The “buttery” attribute of winedi-acetyl – desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 235 – 252.
- BARTOWSKY, E. J. and P. A. HENSCHKE. 2004b. The “buttery” attribute of winedi-acetyl. Desirability, spoilage and beyond. Butter or no butter. In: *Proceedings of the XVIth Entretiens Scientifiques Lallemand*. pp. 11 – 17. Oporto, Portugal.
- BATTILANI, P. and A. PIETRI. 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *Eur. J. Plant Path.* 108: 639 – 643.
- BATTILANI, P., A. LOGRIECO, P. GIORNI, G. COZZI, T. BERTUZZI, and A. PIETRI. 2004. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *J. Sci. Food Agric.* 84: 1736 – 1740.
- BAUCOM, T. L., M. H. TABACCHI, T. H. E. COTTRELL, and B. S. RICHMOND. 1986. Biogenic amine content of New York State wines. *J. Food Sci.* 51: 1376 – 1377.
- BAUER, R., H. A. NEL, and L. M. T. DICKS. 2003. Pediocin PD – 1 as a method to control growth of *Oenococcus oeni* in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 86 – 91.
- BAUZA, T., A. BLAISE, P. L. TEISSEDE, J. P. MESTRES, F. DAUMAS, and J. C. CABANIS. 1995. Changes in biogenic amines content in musts and wines during the winemaking process. *Sci. Aliments* 15: 559 – 570.
- BEECH, F. W. 1993. Yeasts in cider – making. In: *The Yeasts*. A. H. Rose and J. S. Harrison (Eds.), 2nd edition. 5: 169 – 213. Academic Press, London.
- BEECH, F. W., L. F. BURROUGHS, C. F. TIMBERLAKE, and G. C. WHITING. 1979. Progrès récents sur l’aspect chimique et l’action anti – microbienne de l’anhydride sulfureux (SO₂). *Bull. O. I. V.* 52: 1001 – 1022.
- BEELMAN, R. B. 1982. Development and utilization of starter cultures to induce malolactic fermentation in red table wines. In: *Proceedings of the University of California, Davis, Grape and Wine Centennial Symposium*. pp. 109 – 117. University of California, Davis, CA.
- BEELMAN, R. B. and R. E. KUNKEE. 1985. Inducing simultaneous malolactic and alcoholic fermentation in red table wines. In: *Pro-*

- ceedings of the Australian Society for Viticulture and Oenology Seminar on Malolactic Fermentation*, T. H. Lee (Ed.), pp. 97 – 112. Australian Wine Research Institute, Adelaide, South Australia.
- BEELMAN, R. B., A. GAVIN III, and R. M. KEEN. 1977. A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malo – lactic fermentation in Eastern wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 28: 159 – 165.
- BEELMAN, R. B., F. J. McARDLE, and G. R. DUKE. 1980. Comparison of *Leuconostoc oenos* strains ML – 34 and PSU – 1 to induce malolactic fermentation in Pennsylvania red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 269 – 276.
- BEELMAN, R. B., R. M. KEEN, M. J. BANNER, and S. W. KING. 1982. Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Dev. Indust. Microbiol.* 23: 107 – 121.
- BELL, A. A., C. S. OUGH, and W. M. KLEWER. 1979. Effects on must and wine composition, rates of fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 124 – 129.
- BELLÍ, N., S. MARÍN, A. DUAIGÜES, A. J. RAMOS, and V. SANCHIS. 2004. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *J. Sci. Food Agric.* 84: 591 – 594.
- BELTRAN, G., B. ESTEVE – ZARZOSO, N. ROZÉS, A. MAS, and J. M. GUILLAMON. 2005. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agric. Food Chem.* 53: 996 – 1002.
- BENDOVA, O., V. RICHTER, B. JANDEROVA, and J. HAUSLER. 1991. Identification of industrial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 810 – 812.
- BENEDUCE, L., G. SPANO, A. VERNILE, D. TARANTINO, and S. MASSA. 2004. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *J. Basic Microbiol.* 44: 10 – 16.
- BERG, H. W., F. FILIPPELLO, E. HINREINER, and A. D. WEBB. 1955. Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. I. Water solutions of pure substances. *Food Technol.* 9: 23 – 26.
- BERTHELS, N. J., R. R. CORDERO OTERO, F. F. BAUER, J. M. THEVELEIN, and I. S. PRETORIUS. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 4: 683 – 689.
- BEYER, W. F. and I. FRIDOVICH. 1985. Pseudocatalase from *Lactobacillus plantarum*; evidence for a homopentameric structure containing two atoms of manganese per subunit. *Biochem.* 24: 6460 – 6467.
- BISSON, L. F. 1991. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. J. M. Rantz (Ed.), pp. 78 – 89. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA.
- BISSON, L. F. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 107 – 119.
- BISSON, L. F. and R. E. KUNKEE. 1991. Microbial interactions during wine production. In: *Mixed Cultures in Biotechnology*. J. G. Zeikus and E. A. Johnson (Eds.), pp. 37 – 68. McGraw – Hill, New York, NY.
- BISSON, L. F. and C. E. BUTZKE. 2000.

- Diagnosis and rectifications of stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 168 – 177.
- BLESA, J., J. M. SORIANO, J. C. MOLTO, and J. MANES. 2004. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *J. Chromato. A* 1054: 397 – 401.
- BLONDIN, B., R. RATOMAHENINA, A. ARNAUD, and P. GALZY. 1982. A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 2031 – 2037.
- BOEKHOUT, T., C. P. KURTZMAN, K. O'DONNELL, and M. T. SMITH. 1994. Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 781 – 786.
- BOIDO, E., A. LLORET, K. MEDINA, F. CARRAU, and E. DELLACASSA. 2002. Effect of β – glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2344 – 2349.
- BOTHA, A. and J. L. F. KOCK. 1993. Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 39 – 51.
- BOULTON, R. B., V. L. SINGLETON, L. F. BISSON, and R. E. KUNKEE. 1996. *Principles and Practices of Winemaking*. Chapman and Hall Publishers, New York, NY.
- BOUSBOURAS, G. E. and R. E. KUNKEE. 1971. Effect of pH on malo – lactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 22: 121 – 126.
- BRECHOT, P., J. CHAUVET, P. DUPUY, M. CROSON, and A. RABATU. 1971. Acide oleanoïque, facteur de croissance anaérobie de la levure du vin. *C. R. Acad. Sci.* 272: 890 – 893.
- BRETON, A. and Y. SURDIN – KERJAN. 1977. Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study. *J. Bacteriol.* 132: 224 – 232.
- BRITZ, T. J. and R. P. TRACEY. 1990. The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 23 – 31.
- BULT, J. and R. LAFON. 1970. Quelques aspects de la Biologie du *Botrytis cinerea* Pers. agent de la pourriture grise des raisins. *Conn. Vigne Vin* 4: 159 – 174.
- BUSER, H. R., C. ZANTER, and H. TANNER. 1982. Identification of 2, 4, 6 – trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *J. Agric. Food Chem.* 30: 359 – 362.
- BUTZKE, C. E. 1998. Survey of yeast assimilable nitrogen status in musts from California, Oregon, and Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 220 – 224.
- CABAÑES, F. J., F. ACCENSI, M. R. BRAGULAT, M. L. ABARCA, G. CASTELLA, S. MINGUEZ, and A. PONS. 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? *Int. J. Food Microbiol.* 79: 213 – 215.
- CABAROGLU, T., S. SELLI, A. CANBAS, J. – P. LEPOUTRE, and Z. GÜNATA. 2003. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enz. Microbial Technol.* 33: 581 – 587.
- CAILLET, M. M. and Y. VAYSSIER. 1984. Utilisation des biomasses de bactéries lactiques pour le déclenchement de la fermentation malo – lactique. *Rev. Fran. D'Oenol.* 24 (95): 63 – 69.
- CANAS, B. J., D. C. HAVERY, L. R. ROBINSON, M. P. SULLIVAN, F. L. JOE JR.,

- and G. W. DIACHENKO. 1989. Ethyl carba-
mate levels in selected fermented foods and
beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*
Int. 72: 873 – 876.
- CANNON, M. C. and G. J. PILONE. 1993.
Interactions between commercial wine yeast
and malolactic bacteria. In: *The New Zeal-
and Grape and Wine Symposium*. D. T.
Jordan (Ed.), pp. 85 – 95. The New
Zealand Society for Viticulture and Oenology,
Auckland, NZ.
- CAPECE, A., G. SALZANO, and P. ROMANO.
2003. Molecular typing techniques as a tool
to differentiate non – *Saccharomyces* wine spe-
cies. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 33 –
39.
- CAPUCHO, I. and M. V. SAN RAMAO. 1994.
Effect of ethanol and fatty acids on malolactic
activity of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Microbi-
ol. Biotechnol.* 42: 391 – 395.
- CARIDI, A. and V. CORTE. 1997. Inhibition
of malolactic fermentation by cryotolerant
yeasts. *Biotech. Lett.* 19: 723 – 726.
- CARLILE, M. J., S. C. WATKINSON, and G.
W. GOODAY. 2001. *The Fungi*, 2nd edi-
tion. Academic Press, New York, NY.
- CARR, F. J., D. CHILL, and N. MAIDA.
2002. The lactic acid bacteria: a literature
survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281 –
370.
- CARR, J. G., P. A. DAVIES, and A. H.
SPARKS. 1976. The toxicity of sulphur diox-
ide towards certain lactic acid bacteria from
fermented apple juice. *J. Appl. Bacteriol.*
40: 201 – 212.
- CARR, J. G., P. A. DAVIES, F. DELLAGLIO,
M. VESCOVO, and R. A. D. WILLIAMS.
1977. The relationship between *Lactobacillus*
mali from cider and *Lactobacillus yamanash-*
iensis from wine. *J. Appl. Bacteriol.* 42:
219 – 228.
- CARRETE, R., M. T. VIDAL, A. BORDONS,
and M. CONSTANT. 2002. Inhibitory effect
of sulfur dioxide and other stress compounds
in wine on the ATPase activity of *Oenococcus*
oeni. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 155 –
159.
- CARTESIO, M. S. and T. V. CAMPOS. 1988.
Malolactic fermentation in wine; improve-
ment in paper chromatographic techniques.
Am. J. Enol. Vitic. 39: 188 – 189.
- CASEY, G. P., C. A. MAGNUS, and W. M.
INGLEDEW. 1984. High – gravity brewing:
effects of nutrition on yeast composition, fer-
mentative ability, and alcohol production.
Appl. Environ. Microbiol. 48: 639 – 646.
- CASTOR, J. G. B. and J. F. GUYMON.
1952. On the mechanism of formation of
higher alcohols during alcoholic fermentation.
Science 115: 147 – 149.
- CAVAZZA, A., E. POZNANSKI, and G. TRIOLI.
2004. Restart of fermentation of simulated
stuck wines by direct inoculation of active dry
yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 160 –
167.
- CAVIN, J. F., V. ANDIOC, P. X. ETIEVANT,
and C. DIVIES. 1993. Ability of wine lactic
acid bacteria to metabolize phenol carboxylic
acids. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 76 – 80.
- CHALFAN, Y., I. GOLDBERG, and R. I.
MATELES. 1977. Isolation and characteriza-
tion of malo – lactic bacteria from Israeli red
wines. *J. Food Sci.* 42: 939 – 943, 968.
- CHAMPAGNE, C. P., N. GARDNER, and A.
LAFOND. 1989. Production of *Leuconostoc oe-*
nos in apple juice media. *Lebensm. – Wiss.*
Technol. 22: 376 – 381.
- CHANG, P. – K., D. BHATNAGAR, and T. E.
CLEVELAND. 2000. *Aspergillus*. In: *Encyclo-*
pedia of Food Microbiology. R. K. Rob-

- inson, C. A. Batt, and P. D. Patel (Eds.), Volume 1, pp. 62 – 66. Academic Press, New York, NY.
- CHARPENTIER, C. and M. FEUILLAT. 1993. Yeast autolysis. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 7, pp. 225 – 242. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- CHARPENTIER, C., A. M. DOS SANTOS, and M. FEUILLAT. 2004. Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of French flor sherry wine "Vin jaune." *Int. J. Food Microbiol.* 96: 253 – 262.
- CHASSAGNE, D., M. GUILLOUX – BENATIER, H. ALEXANDRE, and A. VOILLEY. 2005. Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chem.* 91: 39 – 44.
- CHATONNET, P., D. DUBOURDIEU, J. – N. BOIDRON, and M. PONS. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60: 165 – 178.
- CHATONNET, P., D. DUBOURDIEU, and J. N. BOIDRON. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 463 – 468.
- CHEN, E. C. H. 1978. The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *Am. Soc. Brew. Chem.* 36: 39 – 43.
- CHISHOLM, M. G. and J. M. SAMUELS. 1992. Determination of the impact of the metabolites of sorbic acid on the odor of a spoiled red wine. *J. Agric. Food Chem.* 40: 830 – 833.
- CIANI, M. and L. FERRARO. 1997. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J. Sci. Food Agric.* 75: 489 – 495.
- CIANI, M. and L. FERRARO. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 247 – 254.
- CIANI, M. and F. MACCARELLI. 1998. Oenological properties of non – *Saccharomyces* yeasts associated with wine – making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 199 – 203.
- CIANI, M. and F. FATICHENTI. 1999. Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 203 – 206.
- CIANI, M. and V. PEPE. 2002. The influence of pre – fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *J. Sci. Food Agric.* 82: 573 – 578.
- CIANI, M., L. FERRARO, and F. FATICHENTI. 2000. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enz. Microbiol. Technol.* 27: 698 – 703.
- CLAISSE, O. and A. LONVAUD – FUNEL. 2000. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiol.* 17: 513 – 519.
- CLEENWERCK, I., K. VANDEMEULEBROECKE, D. JANSSENS, and J. SWINGS. 2002. Reexamination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 52: 1551 – 1558.
- CLEMENTE – JIMENEZ, J. M., L. MINGORANCE – CAZORLA, S. MARTÍNEZ – RODRÍGUEZ, F. J. LAS HERAS – VÁZQUEZ, and F. RODRÍGUEZ – VICO. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* 21: 149 – 155.

- CLESCERI, L. S., A. E. GREENBERG, and R. R. TRUSSELL (Eds.). 1989. Intralaboratory quality control guidelines. In: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17th edition, Part 9020B, pp. 9-5 to 9-23. American Public Health Association. Washington, DC.
- COCAGN - BOUSQUET, M., C. GARRIGUES, P. LOUBIERE, and N. D. LINDLEY. 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 253-267.
- COCOLIN, L. and D. A. MILLS. 2003. Wine yeast inhibition by sulfur dioxide: a comparison of culture - dependent and independent methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 125-130.
- COCOLIN, L., A. HEISEY, and D. A. MILLS. 2001. Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 49-53.
- COCOLIN, L., M. MANZANO, S. REBECCA, and G. COMI. 2002. Monitoring of yeast population changes during a continuous wine fermentation by molecular methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 24-27.
- COFRAN, D. R. and Bro. J. MEYER. 1970. The effect of fumaric acid on malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 21: 189-192.
- COGAN, T. M. and K. N. JORDAN. 1994. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.* 77: 2704-2717.
- COLLINS, E. B. 1972. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.* 55: 1022-1028.
- COLVIN, R. J., L. CHENE, L. C. SOWDEN, and M. TAKAI. 1977. Purification and properties of a soluble polymer of glucose from cultures of *Acetobacter xylinum*. *Can. J. Biochem.* 55: 1057-1063.
- COMITINI, F., J. I. De, L. PEPE, I. MANNAZZU, and M. CIANI. 2004. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 235-240.
- COMITINI, F., R. FERRETTI, F. CLEMENTI, I. MANNAZZU, and M. CIANI. 2005. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound (s) active against *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 99: 105-111.
- CONNELL, L., H. STENDER, and C. G. EDWARDS. 2002. Rapid detection of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 322-324.
- CONNER, A. J. 1983. The comparative toxicity of vineyard pesticides to wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 278-279.
- CONNER, D. E. 1993. Naturally occurring compounds. In: *Antimicrobials in Foods*. P. M. Davidson and A. L. Branen (Eds.), 2nd edition, Chapter 13, pp. 441-468. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- CONSTANT, M., C. REGUANT, M. POBLET, F. ZAMORA, A. MAS, and J. M. GUILLAMON. 1998. Molecular analysis of yeast populations dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 169-175.
- COSTELLO, P. 1988. The conduct of malolactic fermentation under commercial conditions. II. Use of commercial freeze-dried and frozen starter cultures of *Leuconostoc oenos*. *Tech. Rev. Aust. Wine Res. Inst.* 51: 9-12.

- COSTELLO, P. J. and P. A. HENSCHKE. 2002. Mousy off – flavor of wine: precursors and biosynthesis of the causative N – heterocycles 2 – ethyltetrahydropyridine, 2 – acetyltetrahydropyridine, and 2 – acetyl – 1 – pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7079 – 7087.
- COSTELLO, P. J., G. J. MORRISON, T. H. LEE, and G. H. FLEET. 1983. Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Aust.* 35: 14 – 18.
- COSTELLO, P. J., T. H. LEE, and P. A. HENSCHKE. 2001. Ability of lactic acid bacteria to produce N – heterocycles causing mousy off – flavour in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7: 160 – 167.
- COTON, E., G. ROLLAN, A. BERTRAND, and A. LONVAUD – FUNEL. 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 199 – 204.
- COUTO, J. A. and T. A. HOGG. 1994. Diversity of ethanol – tolerant lactobacilli isolated from Douro fortified wine: clustering and identification by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 487 – 491.
- COUTO, J. A., F. NEVES, F. CAMPOS, and T. HOGG. 2005. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 337 – 344.
- COX, D. J. and T. HENICK – KLING. 1989. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.* 171: 5750 – 5752.
- COX, D. J. and T. HENICK – KLING. 1995. Proton motive force and ATP generation during malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 319 – 323.
- CRAIG, J. T. and T. HERESZTYN. 1984. 2 – Ethyl – 3, 4, 5, 6 – tetrahydropyridine – an assessment of its possible contribution to the mousy off – flavour of wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 46 – 48.
- CROWELL, E. A. and J. F. GUYMON. 1963. Influence of aeration and suspended material on higher alcohols, acetoin, and diacetyl during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 14: 214 – 222.
- CROWELL, E. A. and J. F. GUYMON. 1975. Wine constituents arising from sorbic acid addition and identification of 2 – ethoxyhexa – 3, 5 – diene as a source of geranium – like off – odor. *Am. J. Enol. Vitic.* 26: 97 – 102.
- CROWTHER, J. R. 1995. ELISA. Theory and Practice. In: *Methods in Molecular Biology*. J. M. Walker (Ed.), Volume 42. Humana Press, Totowa, NJ.
- D'INCECCO, N., E. BARTOWSKY, S. KASSARA, A. LANTE, P. SPETTOLI, and P. HENSCHKE. 2004. Release of glycosidically bound flavor compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.* 21: 257 – 264.
- DAESCHEL, M. A., D. – S. JUNG, and B. T. WATSON. 1991. Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin – resistant strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 601 – 603.
- DAESCHEL, M. A., T. MUSAFUA – JEKNIC, Y. WU, D. BIZZARRI, and A. VILLA. 2002. High – performance liquid chromatography analysis of lysozyme in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 154 – 157.
- DARRIET, P., M. PONS, S. LAMY, and D. DUBOURDIEU. 2000. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4835 – 4838.
- DARRIET, P., S. LAMY, S. LA GUERCHE, M.

- PONS, D. DUBOURDIEU, D. BLANCARD, P. STELIOPOULOS, and A. MOSANDL. 2001. Stereodifferentiation of geosmin in wine. *Eur. Food Res. Technol.* 213: 122 - 125.
- DAUDT, C. E. and C. S. OUGH. 1980. Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 21 - 23.
- DAVIS, C. R., N. F. A. SILVEIRA, and G. H. FLEET. 1985a. Occurrence and properties of bacteriophage of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 872 - 876.
- DAVIS, C. R., D. WIBOWO, R. ESCHENBRUCH, T. H. LEE, and G. H. FLEET. 1985b. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 290 - 301.
- DAVIS, C. R., D. J. WIBOWO, T. H. LEE, and G. H. FLEET. 1986a. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentations of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 539 - 545.
- DAVIS, C. R., D. J. WIBOWO, T. H. LEE, and G. H. FLEET. 1986b. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 38: 35 - 40.
- DAVIS, C. R., D. WIBOWO, G. H. FLEET, and T. H. LEE. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria; their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 137 - 142.
- DE LEY, J. and J. SCHELL. 1959. Oxidation of several substrates by *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* 77: 445 - 451.
- DE LEY, J. and J. SWINGS. 1984. Genus II. *Gluconobacter*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. J. G. Holt (Ed.), Volume 1, pp. 275 - 278. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- DE LEY, J., J. SWINGS, and F. GOSSELÉ. 1984. Genus I. *Acetobacter*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. N. R. Krieg (Ed.), Volume 1, pp. 268 - 274. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- DE REVEL, G., N. MARTIN, L. PRIPIS - NICOLAU, A. LONVAUD - FUNEL, and A. BERTRAND. 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4003 - 4008.
- DE ROSA, T., G. MARCHERI, I. MORET, G. SCARPONI, and G. VERSINI. 1983. Sorbic acid as a preservative in sparkling wine. Its efficacy and adverse flavor effect associated with ethyl sorbate formation. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 98 - 102.
- DE VUYST, L. and E. J. VANDAMME. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. L. De Vuyst and E. J. Vandamme (Eds.), pp. 91 - 142. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- DEAK, T. 2002. Application of molecular techniques in wine microbiology. *Acta Alimentaria* 31: 37 - 44.
- DEAK, T. and L. R. BEUCHAT. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Inc., New York, NY.
- DECALLONNE, J., M. DELMEE, P. WAUTHOZ, M. EL - LIOUI, and R. LAMBERT. 1991. A rapid procedure for the identification of lactic acid bacteria based on the gas chromatographic analysis of the cellular fatty acids. *J. Food Prot.* 54: 217 - 224.
- DELAGE, N., A. D'HARLINGUE, B. C. CECALDI, and G. BOMPEIX. 2003. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food*

- Cont. 14: 225 - 227.
- DELAQUIS, P., M. CLIFF, M. KING, B. GIL-
RARD, J. HALL, and A. REYNOLDS. 2000.
Effect of two commercial malolactic cultures
on the chemical and sensory properties of
Chancellor wines vinified with different yeasts
and fermentation temperatures. *Am. J. E-
nol. Vitic.* 51: 42 - 48.
- DELCROIX, A., Z. GUNATA, J. C. SAPIS, J.
M. SALMON, and C. BAYONOVE. 1994. Gly-
cosidase activities of three enological yeast
strains during winemaking: effect on the ter-
penol content of Muscat wine. *Am. J. E-
nol. Vitic.* 45: 291 - 296.
- DELFINI, C. 1989. Ability of wine malolactic
bacteria to produce histamine. *Sci. Aliments*
9: 413 - 416.
- DELFINI, C. and A. COSTA. 1993. Effects of
the grape must lees and insoluble materials
on the alcoholic fermentation rate and the
production of acetic acid, pyruvic acid, and
acetaldehyde. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:
86 - 92.
- DELFINI, C., C. COCITO, S. RAVAGLIA, and
L. CONTERNO. 1993. Influence of clarifica-
tion and suspended grape solid materials on
sterol content of free run and pressed grape
musts in the presence of growing yeast cells.
Am. J. Enol. Vitic. 44: 452 - 458.
- DELFINI, C., L. CONTERNO, G. CARPI, P.
ROVERE, A. TABUSSO, C. COCITO, and A.
AMATI. 1995. Microbiological stabilisation of
grape musts and wine by hydrostatic pres-
sures. *J. Wine Res.* 6: 143 - 151.
- DELFINI, C. M. CERSOSIMA, V. DEL PRETE,
M. STRANO, G. GAETANO, A. PAGLIARA,
and S. AMBRÒ. 2004. Resistance screening
essay of wine lactic acid bacteria on lyso-
zyme: efficacy of lysozyme in unclarified
grape musts. *J. Agric. Food Chem.* 52:
1861 - 1866.
- DEWEY, F. M., S. E. EBELER, D. O. AD-
AMS, A. C. NOBLE, and U. M. MEYER.
2000. Quantification of *Botrytis* in grape
juice determined by a monoclonal antibody-
based immunoassay. *Am. J. Enol. Vitic.*
51: 276 - 282.
- DEWEY, F. M., U. MEYER, and C. DANKS.
2005. Rapid immunoassays for stable *Botry-
tis* antigens in pre - and postsymptomatic
grape berries, grape juice and wines. Ab-
str. 56th American Society for Enology Viti-
culture Annual Meeting, Seattle, WA. *Am.
J. Enol. Vitic.* 56: 302A - 303A.
- DHARMADHIKARI, M. R. and K. L. WILKER.
1998. Deacidification of high malate must
with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J.
Enol. Vitic.* 49: 408 - 412.
- DIAS, L., S. DIAS, T. SANCHO, H. STEND-
ER, A. QUEROL, M. MALFEITO - FERREIRA,
and V. LOUREIRO. 2003a. Identification of
yeasts isolated from wine - related environ-
ments and capable of producing 4 - ethylphe-
nol. *Food Microbiol.* 20: 567 - 574.
- DIAS, L., S. PEREIRA - DA - SILVA, M.
TAVARES, M. MALFEITO - FERREIRA, and V.
LOUREIRO. 2003b. Factors affecting the pro-
duction of 4 - ethylphenol by the yeast *Dek-
kera bruxellensis* in enological conditions.
Food Microbiol. 20: 377 - 384.
- DICK, K. J., P. C. MOLAN, and R. ES-
CHENBRUCH. 1992. The isolation from *Saccha-
romyces cerevisiae* of two antibacterial cationic
proteins that inhibit malolactic bacteria. *Vitis*
31: 105 - 116.
- DICKS, L. M. T. and H. J. J. VAN VUUREN.
1988. Identification and physiological char-
acteristics of heterofermentative strains of *Lac-
tobacillus* from South African red wines. *J.
Appl. Bacteriol.* 64: 505 - 513.

- DICKS, L. M. T., F. DELLAGLIO, and M. D. COLLINS. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 395 – 397.
- DITTRICH, H. H. 1977. *Mikrobiologie des Weines. Handbuch der Getranketechnologie.* Ulmer, Stuttgart.
- DITTRICH, H. H., W. R. SPONHOLZ, and W. KAST. 1974. Vergleichende Untersuchungen von Mosten und Weinen aus gesunden und aus Botrytis – infizierten Traubenbeeren. I. Säurestoffwechsel, Zuckerstoffwechselprodukte, Leucoanthocyangehalte. *Vitis* 13: 36 – 49.
- DITTRICH, H. H., W. R. SPONHOLZ, and H. G. GOEBEL. 1975. Vergleichende Untersuchungen von Mosten und Weinen aus gesunden und aus Botrytis – infizierten Traubenbeeren II. Modellversuche zur Veränderung des Mostes durch Botrytis – Infektion und ihre Konsequenzen fuer die Nebenproduktbildung bei der Gaerung. *Vitis* 13: 336 – 347.
- DIVOL, B. and A. LONVAUD – FUNEL. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis – affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99: 85 – 93.
- DLAUCHY, D., J. TORNAI – LEHOCZLI, and G. PETER. 1999. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Sys. Appl. Microbiol.* 22: 445 – 453.
- DOCO, T., P. VUCHOT, V. CHEYNIER, and M. MOUTOUNET. 2003. Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 150 – 157.
- DOIGNON, F. and N. ROZÉS. 1992. Effect of triazole fungicides on lipid metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 172 – 174.
- DONÈCHE, B. J. 1993. Botrytized wines. In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* G. H. Fleet (Ed.), Chapter 11, pp. 327 – 351. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- DONNELLY, D. M. 1977. Airborne microbial contamination in a winery bottling room. *Am. J. Enol. Vitic.* 28: 176 – 181.
- DOORES, S. 1993. Organic acids. In: *Antimicrobials in Foods.* P. M. Davidson and A. L. Branen (Eds.), 2nd edition, pp. 95 – 136. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- DOTT, W., M. HEINZEL, and H. G. TRÜPER. 1976. Sulfite formation by wine yeasts. I. Relationships between growth, fermentation and sulfite formation. *Arch. Microbiol.* 107: 289 – 292.
- DOUGLAS, H. C. and W. V. CRUESS. 1936. A *Lactobacillus* from California wine: *Lactobacillus hilgardii*. *Food Res.* 1: 113 – 119.
- DRYSDALE, G. S. and G. H. FLEET. 1985. Acetic acid bacteria in some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 37: 17 – 20.
- DRYSDALE, G. S. and G. H. FLEET. 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 143 – 154.
- DRYSDALE, G. S. and G. H. FLEET. 1989a. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 471 – 481.
- DRYSDALE, G. S. and G. H. FLEET. 1989b. The growth and survival of acetic acid bacteria in wines at different concentrations of oxygen. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 99 – 105.
- DUPLESSIS, L. D. W. 1963. The microbiology of South African winemaking. Part V. Vitamin and amino acid requirements of lac-

- tic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 6: 485 - 494.
- DU PLESSIS, L. D. W. and J. A. VAN ZYL. 1963a. The microbiology of South African winemaking. Part IV. The taxonomy and incidence of lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 6: 261 - 273.
- DU PLESSIS, L. D. W. and J. A. VAN ZYL. 1963b. The microbiology of South African winemaking. Part VI. Fermentation of D - glucose, D - fructose, D - xylose, and L - arabinose by lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 6: 673 - 688.
- DU PLESSIS, H. W., L. M. T. DICKS, I. S. PRETORIUS, M. G. LAMBRECHTS, and M. DU TOIT. 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 19 - 29.
- DU TOIT, M. and I. S. PRETORIUS. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 74 - 96.
- DU TOIT, W. J. and I. S. PRETORIUS. 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Ann. Microbiol.* 52: 155 - 179.
- DU TOIT, W. J. and M. G. LAMBRECHTS. 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 57 - 64.
- DU TOIT, W. J., I. S. PRETORIUS, and A. LONVAUD - FUNEL. 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98: 862 - 871.
- DUARTE, F. L., C. PAIS, I. SPENCER - MARTINS, and C. LEAO. 1999. Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 49: 1907 - 1913.
- DUBERNET, M., P. RIBÉREAU - GAYON, H. R. LERNER, E. HAREL, and A. M. MAYER. 1977. Purification and properties of laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochem.* 16: 191 - 193.
- DUBOURDIEU, D., P. RIBÉREAU - GAYON, and B. FOURNET. 1981. Structure of the extracellular β - D - glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.* 93: 294 - 299.
- DUBOURDIEU, D., C. GRASSIN, C. DERUCHE, and P. RIBÉREAU - GAYON. 1984. Mise au point d'une mesure rapide de l'activite laccase dans les mouts et dan les vins par la methode a la syringaldazine. Application a l'appréciation de l'état sanitaire des vendages. *Conn. Vigne Vin* 18: 237 - 252.
- DUEÑAS, M., A. IRASTORZA, K. FERNANDEZ, and A. BILBAO. 1995. Heterofermentative lactobacilli causing ropiness in Basque Country ciders. *J. Food Prot.* 58: 76 - 80.
- DUKE, G. R. 1979. Factors influencing the survival and utilization of lyophilized cultures of *Leuconostoc oenos* PSU - 1 for inoculation of wines. Master of Science Thesis. The Pennsylvania State University, Department of Food Science, University Park, PA.
- DUPIN, I. V. S., B. M. MCKINNON, C. RYAN, M. BOULAY, A. J. MARKIDES, G. P. JONES, P. J. WILLIAMS, and E. J. WATERS. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mecha-

- nism of action. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3098 – 3105.
- EDINGER, W. D. 1986. Reducing the use of sulfur dioxide in winemaking. Part I. *Vineyard Winery Manage.* 12 (Nov/Dec): 24 – 27.
- EDINGER, W. D. and D. F. SPLITSTOESSER. 1986. Production by lactic acid bacteria of sorbic alcohol, the precursor of geranium odor compound. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 34 – 38.
- EDWARDS, C. G. 2005. *Illustrated Guide to Microbes and Sediments in Wine, Beer, and Juice*. WineBugs Publishing LLC, Pullman, WA.
- EDWARDS, C. G. and R. B. BEELMAN. 1987. Inhibition of the malolactic bacterium, *Leuconostoc oenos* (PSU – 1) by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghosts. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 239 – 242.
- EDWARDS, C. G. and R. B. BEELMAN. 1989. Inducing malolactic fermentation in wines. In: *Biotechnology Advances*. M. Moo – Young (Ed.), 7: 333 – 360. Pergamon Press, Oxford.
- EDWARDS, C. G. and K. A. JENSEN. 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington state wines; *Pediococcus* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 233 – 238.
- EDWARDS, C. G. and J. C. PETERSON. 1994. Sorbent extraction and analysis of volatile metabolites synthesized by lactic acid bacteria isolated from wines. *J. Food Sci.* 59: 192 – 196.
- EDWARDS, C. G., R. B. BEELMAN, C. E. BARTLEY, and A. L. McCONNELL. 1990. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 48 – 56.
- EDWARDS, C. G., K. A. JENSEN, S. E. SPAYD, and B. J. SEYMOUR. 1991. Isolation and characterization of native strains of *Leuconostoc oenos* from Washington state wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 219 – 226.
- EDWARDS, C. G., J. R. POWERS, K. A. JENSEN, K. M. WELLER, and J. C. PETERSON. 1993. *Lactobacillus* spp. from Washington State wines; isolation and characterization. *J. Food Sci.* 58: 453 – 458.
- EDWARDS, C. G., J. C. PETERSON, T. D. BOYLSTON, and T. D. VASILE. 1994. Interactions between *Leuconostoc oenos* and *Pediococcus* spp. during vinification of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 49 – 55.
- EDWARDS, C. G., K. M. HAAG, M. D. COLLINS, R. HUTSON, and Y. C. HUANG. 1998a. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov., a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 84: 698 – 702.
- EDWARDS, C. G., K. M. HAAG, and M. D. COLLINS. 1998b. Identification of some lactic acid bacteria associated with sluggish/stuck fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 445 – 448.
- EDWARDS, C. G., A. G. REYNOLDS, A. V. RODRIGUEZ, M. J. SEMON, and J. M. MILLS. 1999a. Implication of acetic acid in the induction of slow/stuck grape juice fermentations and inhibition of yeast by *Lactobacillus* sp. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 204 – 210.
- EDWARDS, C. G., K. M. HAAG, M. J. SEMON, A. V. RODRIGUEZ, and J. MILLS. 1999b. Evaluation of processing methods to control the growth of *Lactobacillus kunkeei*, a

- microorganism implicated in sluggish alcoholic fermentations of grape musts. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20: 11 – 19.
- EDWARDS, C. G., M. D. COLLINS, P. A. LAWSON, and A. V. RODRIGUEZ. 2000. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 699 – 702.
- EGLI, C. M. and T. HENICK – KLING. 2001. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 241 – 247.
- EGLI, C. M. W. D. EDINGER, C. M. MITRAKUL, and T. HENICK – KLING. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 779 – 789.
- EGLINTON, J. M. and P. A. HENSCHKE. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* strains AWRI 838, Lalvin EC1118 and Maurivin PDM do not produce excessive sulfur dioxide in white wine fermentations. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2: 77 – 83.
- EL – GENDY, S. M., H. ABDEL – GALIL, Y. SHAHIN, and F. Z. HEGAZI. 1983. Acetoin and diacetyl production by homo – and heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 46: 420 – 425.
- ENGLISH, J. T., A. M. BLEDSE, J. J. MAROIS, and W. M. KLEWER. 1990. Influence of grapevine canopy management on the evaporative potential in the fruit zone. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 137 – 141.
- ERASMUS, D. J., M. CLIFF, and H. J. J. VAN VUUREN. 2004. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 371 – 378.
- ERTEN, H. 2002. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 373 – 378.
- ESAU, P. 1967. Pentoses in wine. I. Survey of possible sources. *Am. J. Enol. Vitic.* 18: 210 – 216.
- ESCHENBRUCH, R. 1974. Sulfite and sulfide formation during wine making. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 25: 157 – 161.
- ESCHENBRUCH, R. and P. BONISH. 1976. Production of sulphite and sulphide by low and high – sulphite forming wine yeasts. *Arch. Microbiol.* 107: 299 – 302.
- ESCHENBRUCH, B. and H. H. DITTRICH. 1986. Metabolism of acetic – acid bacteria in relation to their importance to wine quality. *Zentralbl. Mikrobiol.* 141: 279 – 289.
- ESCHENBRUCH, R., P. BONISH, and B. M. FISHER. 1978. The production of H₂S by pure culture wine yeasts. *Vitis* 17: 67 – 74.
- ESSIA NGANG, J. J., F. LETOURNEAU, E. WOLNIEWICZ, and P. VILLA. 1990. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 490 – 493.
- ESTEBAN, A., M. LOURDES ABARCA, M. ROSA BRAGULAT, and F. JAVIER CABAÑES. 2004. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Res. Microbiol.* 155: 861 – 866.
- ESTEVE – ZARZOSO, B., P. MANZANARES, D. RAMÓN, and A. QUEROL. 1998. The role of non – *Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int. Microbiol.* 1: 143 – 149.
- EWART, A. J. W., N. J. HASELGROVE, J. H. SITTERS, and R. YOUNG. 1989. The effect of *Botrytis cinerea* on the color of *Vitis*

- vinifera cv. Pinot Noir. *Proceedings of the Seventh Australian Wine Industry Technology Conference*. P. J. Williams D. M. Davidson, and T. H. Lee (eds.). Australian Wine Research Institute, pp. 229 – 230.
- FERRANDO, M., C. GUÉLL, and F. LOPEZ. 1998. Industrial wine making: comparison of must clarification treatments. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1523 – 1528.
- FEUILLAT, M. 2003. Yeast macromolecules: origin, composition, and enological interest. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 211 – 213.
- FEUILLAT, M., M. GUILLOUX – BENATIER, and V. GERBAUX. 1985. Essais d'activation de la fermentation malolactique dans les vins. *Sci. Aliments* 5: 103 – 122.
- FINNEY, M. 1993. Pulsed – field gel electrophoresis. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (Eds.), Volume 1, pp. 2. 5. 9 – 2. 5. 17. Green – Wiley, New York, NY.
- FIRME, M. P., M. C. LEITAO, and M. V. SAN RAMAO. 1994. The metabolism of sugar and malic acid by *Leuconostoc oenos*: effect of malic acid, pH, and aeration conditions. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 173 – 181.
- FLEET, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 11 – 22.
- FLEET, G. H. and G. M. HEARD. 1993. Yeasts – Growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 2, pp. 27 – 55. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- FLEET, G. H., S. LAFON – LAFOURCADE, and P. RIBEREAU – GAYON. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1034 – 1038.
- FLOWERS, R. S., J. S. GECAN, and D. J. PUSCH. 1992. Laboratory quality assurance. In: *Compendium of Microbiological Methods for the Examination of Foods*. C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser (Eds.), 3rd edition, Chapter 1, pp. 1 – 23. American Public Health Association, Washington, DC.
- FONSECA, A., J. W. FELL, C. P. KURTZMAN, and I. SPENCER – MARTINS. 2000. *Candida tartarivorans* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast with the capacity to degrade L (+) – and meso – tartaric acid. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 50: 389 – 394.
- FORNACHON, J. C. M. 1957. The occurrence of malolactic fermentation in Australian wines. *Aust. J. Appl. Sci.* 8: 120 – 129.
- FORNACHON, J. C. M. 1963. Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. *J. Sci. Food Agric.* 14: 857 – 862.
- FORNACHON, J. C. M. 1968. Influence of different yeasts on the growth of lactic acid bacteria in wine. *J. Sci. Food Agric.* 19: 374 – 378.
- FORNACHON, J. C. M. and B. LLOYD. 1965. Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. *J. Sci. Food Agric.* 16: 710 – 716.
- FORNACHON, J. C. M., H. C. DOUGLAS, and R. H. VAUGHN. 1949. *Lactobacillus trichodes* nov. spec., a bacterium causing spoilage in appetizer and dessert wines. *Hilgardia* 19: 129 – 132.
- FOY, J. J. 1994a. Use and manufacturing of active dry wine yeast cultures. In: *Proceedings of the New York Wine Industry Workshop*. T. Henick – Kling (Ed.), pp. 21 – 28.

- Geneva, NY.
- FOY, J. J. 1994b. Evaluation of commercial active dry wine yeast. In: *Proceedings of the New York Wine Industry Workshop*. T. Henick - Kling (Ed.), pp. 29 - 38. Geneva, NY.
- FRANK, J. F. and R. CHMIELEWSKI. 2001. Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel. *J. Food Prot.* 64: 1178 - 1182.
- FRANTA, B. D., L. R. MATICK, and J. W. SHERBON. 1986. The analysis of pentoses in dry wine by high performance liquid chromatography with post - column derivatization. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 269 - 274.
- FREER, S. N. 2002. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 271 - 275.
- FUGELSANG, K. C. and B. W. ZOECKLEIN. 1993. MLF Survey. *Pract. Winery Vineyard* 14 (May/June): 12 - 18.
- FUGELSANG, K. C. and B. W. ZOECKLEIN. 2003. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 294 - 300.
- FUGELSANG, K. C., M. M. OSBORN, and C. J. MULLER. 1993. *Brettanomyces* and *Dekkera*. Implications in winemaking. In: *Beer and Wine Production*. B. H. Gump (Ed.), 536: 110 - 129. American Chemical Society, Washington, DC.
- FUMI, M. D., G. TRIOLI, M. G. COLOMBI, and O. COLAGRANDE. 1988. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottlefermented sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 267 - 272.
- G - ALEGRIA, E., I. LOPEZ, J. I. RUIZ, J. SAENZ, E. FERNANDEZ, M. ZARAZAGA, M. DIZY, C. TORRES, and F. RUIZ - LARREA. 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230: 53 - 61.
- GALLANDER, J. F. 1977. Deacidification of Eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 28: 65 - 68.
- GAMBARO, A., E. BOIDO, A. ZLOTEJABIKO, K. MEDINA, A. LLORET, E. DELLACASSA, and F. CARRAU. 2001. Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7: 27 - 32.
- GAO, C. and G. H. FLEET. 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 405 - 409.
- GARVIE, E. I. 1967a. *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 48: 431 - 438.
- GARVIE, E. I. 1967b. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *J. Gen. Microbiol.* 48: 439 - 447.
- GARVIE, E. I. 1974. Nomenclatural problems of the pediococci. Request for an opinion. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 24: 301 - 306.
- GARVIE, E. I. 1976. Hybridization between the deoxyribonucleic acids of some strains of heterofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 26: 116 - 122.
- GARVIE, E. I. 1984. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Meth. Microbiol.* 16: 147 - 178.
- GARVIE, E. I. 1986a. Genus *Leuconostoc*.

- In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.), pp. 1071 - 1075. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- GARVIE, E. I. 1986b. Genus *Pediococcus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.), pp. 1075 - 1079. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- GARVIE, E. I. and L. A. MABBITT. 1967. Stimulation of growth of *Leuconostoc oenos* by tomato juice. *Arch. Microbiol.* 55: 398 - 407.
- GERBAUX, V., A. VILLA, C. MONAMY, and A. BERTRAND. 1997. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 49 - 54.
- GERBAUX, V., B. VINCENT, and A. BERTRAND. 2002. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 131 - 137.
- GERGELY, S., E. BEKASSY - MOLNAR, and Gy. VATAI. 2003. The use of multiobjective optimization to improve wine filtration. *J. Food Eng.* 58: 311 - 316.
- GIANNAKOPOULOS, P. I., P. MARKAKIS, and G. S. HOWELL. 1984. The influence of malolactic strain on the fermentation and wine quality of three Eastern red wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 1 - 4.
- GIBSON, T. and Y. ABDEL - MALEK. 1945. The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* 14: 35 - 44.
- GIL, J. V., J. J. MATEO, M. JIMENEZ, A. PASTOR, and T. HUERTA. 1996. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* 61: 1247 - 1266.
- GILLILAND, R. B. and J. P. LACEY. 1964. Lethal action by an *Acetobacter* on yeasts. *Nature* 202: 727 - 728.
- GINDREAU, E., E. WALLING, and A. LONVAUD - FUNEL. 2001. Direct polymerase chain reaction detection of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine. *J. Appl. Microbiol.* 90: 535 - 542.
- GINI, B. and R. H. VAUGHN. 1962. Characteristics of some bacteria associated with the spoilage of California dessert wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 13: 20 - 31.
- GLÓRIA, M. B. A., B. T. WATSON, L. SIMON - SARKADI, and M. A. DAESCHEL. 1998. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 279 - 282.
- GODSHALL, M. A. 1997. How carbohydrates influence food flavor. *Food Tech.* 51: 63 - 67.
- GOLDSTEIN, A. and J. O. LAMPEN. 1975. β - D - Fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Meth. Enzymol.* 42: 504 - 511.
- GOÑI, D. T. and C. A. AZPILICUETA. 2001. Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines; relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 185 - 190.
- GONCALVES, F., A. HEYRAUD, M. NORBERTA DE PINHO, and M. RINAUDO. 2002. Characterization of white wine mannoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6097 - 6101.
- GONZALEZ, A., N. HIERRO, M. POBLET, A. MAS, and J. M. GUILLAMON. 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production.

- Int. J. Food Microbiol.* 102: 295 – 304.
- GONZALEZ – TECHERA, A., S. JUBANY, F. M. CARRAU, and C. GAGGERO. 2001. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 71 – 75.
- GORGA, A., O. CLAISSE, and A. LONVAUD – FUNEL. 2002. Organisation of the genes encoding glycerol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus diolivorans*. *Sci. Aliments* 22: 151 – 160.
- GOTO, S., K. TAKAYAMA, and T. SHINOHARA. 1989. Occurrence of molds in wine storage cellars. *J. Ferm. Bioeng.* 68: 230 – 232.
- GOTTSCHALK, G. 1986. *Bacterial Metabolism*, 2nd edition. Springer – Verlag, New York, NY.
- GRADWOHL, R. B. H. 1948. *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. 4th edition, Volume II, pp. 1400 – 1401. The C. V. Mosby Company, St. Louis, MO.
- GRANCHI, L., M. BOSCO, A. MESSINI, and M. VINCENZINI. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR – RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.* 87: 949 – 956.
- GRBIN, P. R. and P. A. HENSCHKE. 2000. Mousy off – flavor production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 255 – 262.
- GREENE, A. K., P. J. VERGANO, B. K. FEW, and J. C. SERAFINI. 1994. Effect of ozonated water sanitization on gasket materials used in fluid food processing. *J. Food Eng.* 21: 439 – 446.
- GRIMALDI, A., H. MCLEAN, and V. JIRANEK. 2000. Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 362 – 369.
- GROAT, M. and C. S. OUGH. 1978. Effects of insoluble solids added to clarified musts on fermentation rate, wine composition, and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 112 – 119.
- GUERZONI, E. and R. MARCHETTI. 1987. Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 571 – 576.
- GUIDICI, P. and R. E. KUNKEE. 1994. The effect of nitrogen deficiency and sulfur containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 107 – 112.
- GUILLOUX – BENATIER, M., M. FEUILLAT, and B. CIOLFI. 1985. Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L – malique par les bactéries lactiques isolées du vin: effet stimulant des autolysate du levures. *Vitis* 24: 59 – 74.
- GUITART, A., P. H. ORTE, and J. CACHO. 1998. Effect of different clarification treatments on the amino acid content of Chardonnay musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 389 – 396.
- GÜNATA, Y. Z., C. L. BAYONOVE, R. L. BAUMES, and R. E. CORDONNIER. 1986. Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during the wine processing: preliminary results. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 112 – 114.
- GÜNATA, Y. Z., C. L. BAYONOVE, C. TAPIERO, and R. E. CORDONNIER. 1990. Hydrolysis of grape monoterpenyl β – D – glucosides by various β – glucosidases. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1232 – 1236.

- GUYMON, J. F., J. L. INGRAHAM, and E. A. CROWELL. 1961. Influence of aeration upon the formation of higher alcohols by yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 12: 60-66.
- HALLINAN, C. P., D. J. SAUL, and V. JIRANEK. 1999. Differential utilisation of sulfur compounds for H₂S liberation by nitrogen-starved wine yeasts. *Aust. J. Grape Wine Res.* 5: 82-90.
- HAMPSON, B. 2000. Use of ozone for winery and environmental sanitation. *Pract. Winery Vineyard* 20 (Jan/Feb): 27-30.
- HANSEN, E. H., P. NISSEN, P. SOMMER, J. C. NIELSEN, and N. ARNEBORG. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91: 541-547.
- HARRIGAN, W. F. 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*, 3rd edition. Academic Press, New York, NY.
- HARTMAN, P. A., B. SWAMINATHAN, M. S. CURIALE, R. FIRSTENBERG-EDEN, A. N. SHARPE, N. A. COX, D. Y. C. FUNG, and M. C. GOLDSCHMIDT. 1992. Rapid methods and automation. In: *Compendium of Microbiological Methods for the Examination of Foods*. C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser (Eds.), 3rd edition, Chapter 39, pp. 665-746. American Public Health Association, Washington, DC.
- HAWKER, J. S., H. P. RUFFNER, and R. R. WALKER. 1976. The sucrose content of some Australian grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 27: 125-129.
- HAYMAN, D. C. and P. R. MONK. 1982. Starter culture preparation for the induction of malolactic fermentation in wine. *Food Tech. Aust.* 34: 14-18.
- HEARD, G. M. and G. H. FLEET. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 727-728.
- HEARD, G. M. and G. H. FLEET. 1986. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 38: 22-25.
- HEARD, G. M. and G. H. FLEET. 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 23-28.
- HEINTZE, K. 1976. Über die gegenseitige Beeinflussung von Sorbinsäure und schwefliger Säure. *Die Industrielle Obst- und Gemüseverwertung* 61: 555-556.
- HENICK-KLING, T. 1993. Malolactic fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 10, pp. 286-326. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- HENICK-KLING, T. 1994. Nitrogen requirement by yeasts during fermentation. In: *Proceedings of the New York Wine Industry Workshop*. T. Henick-Kling (Ed.), pp. 65-69. Geneva, NY.
- HENICK-KLING, T. 1995. Control of malolactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.* 79: 29S-37S.
- HENICK-KLING, T. and Y. H. PARK. 1994. Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO₂ and timing of inoculation. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 464-469.
- HENICK-KLING, T., T. H. LEE, and D. J. D. NICHOLAS. 1986a. Inhibition of bacterial growth and malolactic fermentation in wine by

- bacteriophage. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 287 – 293.
- HENICK – KLING, T., T. H. LEE, and D. J. D. NICHOLAS. 1986b. Characterization of the lytic activity of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* isolated from wine. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 525 – 534.
- HENICK – KLING, T., T. E. ACREE, S. A. KRIEGER, M. H. LAURENT, and W. D. EDINGER. 1994. Modification of wine flavor by malolactic fermentation. In: *Proceedings from the New York Wine Industry Workshop*. T. Henick – Kling (Ed.), pp. 120 – 138. Cornell University, Geneva, NY.
- HENICK – KLING, T., W. EDINGER, P. DANIEL, and P. MONK. 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* 84: 865 – 876.
- HENSCHKE, P. A. and V. JIRANEK. 1991. Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape must. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. J. M. Rantz (Ed.), pp. 172 – 184. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA.
- HENSCHKE, P. A. and V. JIRANEK. 1993. Yeasts—Metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 4, pp. 77 – 165. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- HENSCHKE, P. A., J. M. EGLINTON, P. J. COSTELLO, I. L. FRANCIS, H. GOCKOWIAK, A. SODEN, and P. B. HØJ. 2002. Wine-making with selected strains of non – *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. Influence of *Candida stellata* and *Saccharomyces bayanus* on Chardonnay wine composition and flavour. In: *Proceedings of the 13th International Enology Symposium*. H. Trogus, J. Gafner, and A. Sütterlin (Eds.), pp. 459 – 481, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Montpellier, France (June 9 – 12).
- HENSEL, R., U. MAYR, K. O. STETTER, and O. KANDLER. 1977. Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the allosteric L – lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei* spp. *Casei* and *Lactobacillus curvatus*. *Arch. Microbiol.* 112: 81 – 93.
- HERESZTYN, T. 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 127 – 132.
- HERNANDEZ – ORTE, P., A. GUTTART, V. FERREIRA, J. GARCIA, and J. CACHO. 1998. Effect of maceration time and the addition of enzymes on the amino acid composition of musts and wines and its influence on wine aroma. *Food Sci. Tech. Int.* 4: 407 – 418.
- HERRAZ, T., G. REGLERO, M. HERRAZ, P. J. MARTIN – ALVAREX, and M. D. CABEZUDO. 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 313 – 318.
- HOLLOWAY, P. and R. E. SUBDEN. 1991. Volatile metabolites produced in a Riesling must by wild yeast isolates. *Can. Inst. Sci. Technol. J.* 24: 57 – 59.
- HOLLOWAY, P., R. E. SUBDEN, and M. A. LACHANCE. 1990. The yeasts in a Riesling must from the Niagara grape – growing region

- of Ontario Canada. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23: 212 - 216.
- HOLT, S. M. and G. L. COTE. 1998. Differentiation of dextran - producing *Leuconostoc* strains by a modified randomly amplified polymorphic DNA protocol. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3096 - 3098.
- HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY, and S. T. WILLIAMS. 1994. Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. J. G. Holt (Ed.), pp. 71 - 84. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- HOLZAPFEL, W. H. and U. SCHILLINGER. 1992. The genus *Leuconostoc*. In: *The Prokaryotes*. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. - H. Schleifer (Eds.), 2nd edition, Volume II, Chapter 69, pp. 1508 - 1534. Springer - Verlag, New York, NY.
- HOOD, A. 1983. Inhibition of growth of wine lactic - acid bacteria by acetaldehydebound sulphur dioxide. *Aust. Grapegrow. Wine.* 232: 34 - 43.
- HOUTMAN, A. C., J. MARAIS, and C. S. DU PLESSIS. 1980a. The possibilities of applying present - day knowledge of wine aroma components: influence of several juice factors on fermentation rate and ester production during fermentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 1: 27 - 33.
- HOUTMAN, A. C., J. MARAIS, and C. S. DU PLESSIS. 1980b. Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of wines. I. Grape maturity, sugar, inoculum concentration, aeration, juice turbidity and ergosterol. *Vitis* 19: 37 - 54.
- HUANG, Z. and C. S. OUGH. 1989. Effect of vineyard locations, varieties, and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 135 - 139.
- HUANG, Z. and C. S. OUGH. 1991. Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 261 - 267.
- HUANG, Z. and C. S. OUGH. 1993. Identification of N - carbamyl amino acids in wines and in yeast cells. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 49 - 55.
- HUANG, Y. - C., C. G. EDWARDS, J. C. PETERSON, and K. M. HAAG. 1996. Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 1 - 10.
- HURST, A. and D. G. HOOVER. 1993. Nisin. In: *Antimicrobials in Foods*. P. M. Davidson and A. L. Branen (Eds.), 2nd edition, Chapter 10, pp. 369 - 394. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- IBEAS, J. I., I. LOZANO, F. PERDICONES, and J. F. JIMENEZ. 1996. Detection of *Dekkera* - *Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 998 - 1003.
- ILAGAN, R. D. 1979. *Studies on the Sporulation of Dekkera*. Master of Science Thesis, University of California, Davis, CA.
- INGLEDEW, W. M. and R. E. KUNKEE. 1985. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 65 - 76.
- IZUAGBE, Y. S., T. P. DOHMAN, W. E. SANDINE, and D. A. HEATHERBELL. 1985. Characterization of *Leuconostoc oenos* isolated from Oregon wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 680 - 684.
- JACK, R. W., J. R. TAGG, and B. RAY.

1994. Bacteriocins of Gram - positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171 - 200.
- JACKSON, R. S. 2000. *Wine Science. Principles, Practices, Perception*, 2nd edition. Academic Press, New York, NY.
- JACOBS, C. J. and H. J. J. VAN VUUREN. 1991. Effects of different killer yeasts on wine fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 295 - 300.
- JARISCH, R. and F. WANTKLE. 1996. Wine and headache. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 110: 7 - 12.
- JENNINGS, W. G. 1965. Theory and practice of hard surface cleaning. *Adv. Food Res.* 14: 325 - 359.
- JENSEN, K. A. and C. G. EDWARDS. 1991. Modification of the API rapid CH system for characterization of *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 274 - 277.
- JIRANEK, V., P. LANGRIDGE, and P. A. HENSCHKE. 1995a. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine - producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 461 - 467.
- JIRANEK, V., P. LANGRIDGE, and P. A. HENSCHKE. 1995b. Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 75 - 83.
- JIRANEK, V., P. LANGRIDGE, and P. A. HENSCHKE. 1995c. Validation of bismuth - containing indicator media for predicting H₂S - producing potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 269 - 273.
- JIRANEK, V., P. LANGRIDGE, and P. A. HENSCHKE. 1996. Determination of sulphite reductase activity and its response to assimilable nitrogen status in a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 329 - 336.
- JOHANSSON, M. L., M. QUEDNAU, G. MOLIN, and S. AHRNE. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 155 - 159.
- JOHNSTON, M. A. and E. A. DELWICHE. 1962. Catalase of the Lactobacillaceae. *J. Bacteriol.* 83: 936 - 938.
- JOLLY, N. P., O. P. H. AUGUSTYN, and I. S. PRETORIUS. 2003. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24: 63 - 69.
- JOYEUX, A., S. LAFON - LAFOURCADE, and P. RIBÉREAU - GAYON. 1984a. Metabolism of acetic acid bacteria in grape must: consequences on alcoholic and malolactic fermentation. *Sci. Aliments* 4: 247 - 255.
- JOYEUX, A., S. LAFON - LAFOURCADE, and P. RIBÉREAU - GAYON. 1984b. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 153 - 156.
- JULIEN, A., J. - L. ROUSTAN, L. DULAU, and J. - M. SABLAYROLLES. 2000. Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: technological consequences. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 215 - 222.
- KALATHENOS, P., J. P. SUTHERLAND, and T. A. ROBERTS. 1995. Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 245 - 250.
- KAMINSKI, E., S. STAWICKI, and E. WASOWICZ. 1974. Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fungi imperfecti*. *Appl. Microbiol.* 27: 1001 - 1004.

- KANDER, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209 - 224.
- KANDLER, O. and N. WEISS. 1986. Genus *Lactobacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.), pp. 1209 - 1234. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
- KARAGIANNIS, S. and P. LANARIDIS. 1999. The effect of various vinification parameters on the development of several volatile sulfur compounds in Greek white wines of the cultivars Batiki and Muscat of Hamburg. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 334 - 342.
- KARAS, M., D. BACHMANN, U. BAHR, and F. HILLENKAMP. 1987. Matrix - assisted ultraviolet laser desorption of non - volatile compounds. *Int. J. Mass Spec. Ion Process.* 78: 53 - 68.
- KELLY, W. J., R. V. ASMUNDSON, and D. H. HOPCROFT. 1989. Growth of *Leuconostoc oenos* under anaerobic conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 277 - 282.
- KELLY, W. J., C. M. HUANG, and R. V. ASMUNDSON. 1993. Comparison of *Leuconostoc oenos* strains by pulsed - field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3969 - 3972.
- KHADRE, M. A., A. E. YOUSEF, and J. - G. KIM. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J. Food Sci.* 66: 1242 - 1252.
- KING, A. D., J. D. PONTING, D. W. SANSHUCK, R. JACKSON, and K. MIHARA. 1981. Factors affecting death of yeast by sulfur dioxide. *J. Food Prot.* 44: 92 - 97.
- KING, S. W. and R. B. BEELMAN. 1986. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 53 - 60.
- KITAHARA, K., T. KANEKO, and O. GOTO. 1957. Taxonomic studies on the hiochibacteria, specific saprophytes of sake. II. Identification and classification of hiochi - bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3: 111 - 120.
- KITOS, P. A., C. H. WANG, B. A. MOHLER, T. E. KING, and V. H. CHELDELIN. 1958. Glucose and gluconate dissimilation in *Acetobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.* 233: 1295 - 1298.
- KLINGSHIRN, L. M., J. R. LIU, and J. F. GALLANDER. 1987. Higher alcohol formation in wines as related to the particle size profiles of juice insoluble solids. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 207 - 210.
- KODAMA, S., T. SUZUKI, S. FUJINAWA, P. DE LA TEJA, and F. YOTSUZUKA. 1994. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 17 - 24.
- KONO, Y. and I. FRIDOVICH. 1983. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus*. *J. Biol. Chem.* 258: 6015 - 6019.
- KOSSE, D., H. SEILER, R. AMANN, W. LUDWIG, and S. SCHERER. 1997. Identification of yoghurt - spoiling yeasts with 18S rRNA - targeted oligonucleotide probes. *Sys. Appl. Microbiol.* 20: 468 - 480.
- KOSSEVA, M., V. BESCHKOV, J. F. KENNEDY, and L. L. LLOYD. 1998. Malolactic fermentation in Chardonnay wine by immobilized *Lactobacillus casei* cells. *Process Biochem.* 33: 793 - 797.
- KOTSERIDIS, Y. and R. BAUMES. 2000. Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juices, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced

- wine. *J. Agric. Food Chem.* 48: 400 – 406.
- KRIEGER, S. A., W. P. HAMMES, and T. HENICK – KLING. 1990. Management of malolactic fermentation using starter cultures. *Vineyard Winery Manage.* 16 (Nov/Dec): 45 – 50.
- KRIEGER, S. A., W. P. HAMMES, and T. HENICK – KLING. 1993. How to use malolactic starter cultures in the winery. *Wine Ind. J.* (May): 153 – 160.
- KRUMPERMAN, P. H. and R. H. VAUGHN. 1966. Some lactobacilli associated with decomposition of tartaric acid in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 17: 185 – 190.
- KUDO, M., P. VAGNOLI, and L. F. BISSON. 1988. Imbalance of pH and potassium concentration as a cause of stuck fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 295 – 301.
- KUMAR, C. G. and S. K. ANAND. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 9 – 27.
- KUNIYUKI, A. H., C. ROUS, and J. L. SANDERSON. 1984. Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) detection of *Brettanomyces* contaminants in wine production. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 143 – 145.
- KUNKEE, R. E. 1967a. Control of malo – lactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. *Am. J. Enol. Vitic.* 18: 71 – 77.
- KUNKEE, R. E. 1967b. Malo – lactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 9: 235 – 279.
- KUNKEE, R. E. 1968. A simplified chromatographic procedure for detection of malo – lactic fermentation. *Wines Vines* 49 (Mar): 23 – 24.
- KUNKEE, R. E. 1974. Malo – lactic fermentation and winemaking. In: *Chemistry of Winemaking*. A. D. Webb (Ed.), pp. 151 – 170. American Chemical Society, Washington, DC.
- KUNKEE, R. E. 1984. Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentations. *Food Microbiol.* 1: 315 – 332.
- KUNKEE, R. E. 1996. Several decades of wine microbiology: have we changed or have the microbes? In: *Proceedings of the Wine Spoilage Microbiology Conference*. pp. 44 – 49. California State University Fresno, CA.
- KUNKEE, R. E. and F. NERADT. 1974. A rapid method for detection of viable yeasts in wines. *Wine Vines* 55: 36 – 39.
- KUNKEE, R. E., C. S. OUGH, and M. A. AMERINE. 1964. Induction of malo – lactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 15: 178 – 183.
- KUPINA, S. A. 1984. Simultaneous quantitation of glycerol, acetic acid and ethanol in grape juice by high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 59 – 62.
- KURTZMAN, C. P. 1998a. *Issatchenkia* Kudryavtsev emend. Kurtzman, Smiley, and Johnson. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 35, pp. 221 – 226. Elsevier, New York, NY.
- KURTZMAN, C. P. 1998b. *Pichia* E. C. Hansen emend. Kurtzman. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 42, pp. 273 – 352. Elsevier, New York, NY.
- KURTZMAN, C. P. 1998c. *Zygosaccharomyces* Barker. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 57, pp. 424 – 432. Elsevier, New

- York, NY.
- LAFON - LAFOURCADE, S. 1983. Wine and brandy. In: *Biotechnology. Food and Feed Production with Microorganisms*. H. J. Rehm and G. Reed (Eds.), Volume 5, pp. 81 - 163. Verlag Chemie, Weinheim, West Germany.
- LAFON - LAFOURCADE, S. and P. RIBÉREAU - GAYON. 1984. Les alterations des vins par les bacteries acetiques et les bacteries lactiques. *Conn. Vigne Vin* 18: 67 - 82.
- LAFON - LAFOURCADE, S., F. LARUE, and P. RIBÉREAU - GAYON. 1979. Evidence for the existence of "survival factors" as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1069 - 1073.
- LAFON - LAFOURCADE, S., E. CARRE, A. LONVAUD - FUNEL, and P. RIBÉREAU - GAYON. 1983a. Induction de la fermentation malolactique des vins par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *L. oenos* après réactivation. *Conn. Vigne Vin* 17: 55 - 71.
- LAFON - LAFOURCADE, S., E. CARRE, and P. RIBÉREAU - GAYON. 1983b. Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of the vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 874 - 880.
- LAMBRECHTS, M. G. and I. S. PRETORIUS. 2000. Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 97 - 129 (special issue).
- LARSEN, J. T., J. C. NIELSEN, B. KRAMP, M. RICHELIEU, M. J. RIESAGER, N. ARNEBORG, and C. G. EDWARDS. 2003. Impact of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 246 - 251.
- LAURENT, M. - H., T. HENICK - KLING, and T. E. ACREE. 1994. Changes in the aroma and odor of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Wein - Wiss.* 49: 2 - 9.
- LAVALLEE, F., Y. SALVAS, S. LAMY, D. Y. THOMAS, R. DEGRÉ, and L. DULAU. 1994. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in production of wine yeast strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 86 - 91.
- LAWRENCE, N. L., D. C. WILSON, and C. S. PEDERSON. 1959. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures. II. The types of yeast and their growth in pure culture. *Appl. Microbiol.* 7: 7 - 11.
- LAY, H. 2003. Untersuchungen ueber die Entstehung des "Maeuseltons" in Wein und Modellloesungen. *Mitt. Klosterneuburg* 53: 243 - 250.
- LEE, S. - J., D. RATHBONE, S. ASIMONT, R. ADDEN, and S. E. EBELER. 2004. Dynamic changes in ester formation during Chardonnay juice fermentations with different yeast inoculation and initial Brix conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 346 - 354.
- LEE, T. H. and R. F. SIMPSON. 1993. Microbiology and chemistry of cork taints in wine. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 12, pp. 353 - 372. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- LEMA, C., C. GARCIA - JARES, I. ORRIOLS, and L. ANGULO. 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non - *Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 206 - 216.
- LEMARESQUIER, H. 1987. Inter - relationships between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the Champagne area and lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 4: 91 - 94.

- LEROI, F. and M. PIDOUX. 1993. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 54 - 60.
- LICKER, J. L., T. E. ACREE, and T. HENICK-KLING. 1999. What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavor? A preliminary investigation. In: *Chemistry of Wine Flavor*. A. L. Watrous and S. E. Ebeler (Eds.), pp. 96 - 115. American Chemical Society, Washington, DC.
- LIU, J. - W. R. and J. F. GALLANDER. 1982. Effect of insoluble solids on the sulfur dioxide content and rate of malolactic fermentation in white table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 194 - 197.
- LIU, J. and J. F. GALLANDER. 1983. Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 44 - 46.
- LIU, S. - Q. 2002. A review. Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 92: 589 - 601.
- LIU, S. - Q. and C. R. DAVIS. 1994. Analysis of wine carbohydrates using capillary gas liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 229 - 234.
- LIU, S. - Q. and G. J. PILONE. 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35: 49 - 61.
- LIU, S. - Q., G. G. PRITCHARD, M. J. HARDMAN, and G. J. PILONE. 1994. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 235 - 242.
- LIU, S. - Q., C. R. DAVIS, and J. D. BROOKS. 1995a. Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 166 - 174.
- LIU, S. - Q., G. G. PRITCHARD, M. J. HARDMAN, and G. J. PILONE. 1995b. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 310 - 316.
- LILAUBÉRES, R. M., B. RICHARD, A. LONVAUD, D. DUBOURDIEU, and B. FOURNET. 1990. Structure of an exocellular β - D - glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. *Carb. Res.* 203: 103 - 107.
- LILAURADO, J. M., N. ROZÉS, M. CONSTANT, and A. MAS. 2005. Study of some *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking after preadaptation at low temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1003 - 1011.
- LONGO, E., J. CANSADO, D. AGRELO, and T. G. VILLA. 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 141 - 144.
- LONVAUD - FUNEL, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 317 - 331.
- LONVAUD - FUNEL, A. 2001. Biogenic amines in wine: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 199: 9 - 13.
- LONVAUD - FUNEL, A. and A. JOYEUX. 1988. A bacterial disease causing ropiness of wines. *Sci. Aliments* 8: 33 - 50.
- LONVAUD - FUNEL, A. and A. JOYEUX. 1993. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Food Microbiol.* 10: 411 - 419.

- LONVAUD - FUNEL, A. and A. JOYEUX. 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine - producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 401 - 407.
- LONVAUD - FUNEL, A., C. DESENS, and A. JOYEUX. 1985. Stimulation de la fermentation malolactique par l'addition au vin d'enveloppes cellulaires de levure adjuvants de nature polysaccharidique et azotée. *Conn. Vigne Vin* 19: 229 - 240.
- LONVAUD - FUNEL, A., A. JOYEUX, and C. DESENS. 1988. Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Sci. Food Agric.* 44: 183 - 191.
- LONVAUD - FUNEL, A., A. JOYEUX, and O. LEDOUX. 1991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non - isotopic DNA probes. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 501 - 508.
- LOUREIRO, V. 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Res. Int.* 33: 247 - 256.
- LOUREIRO, V. and A. QUEROL. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci. Tech.* 10: 356 - 365.
- LOUREIRO, V. and M. MALFEITO - FERREIRA. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 23 - 50.
- LOUW, A. 2001. The occurrence of bitterness in wine: an overview. *Wynboer* 149: 95 - 100.
- LUBBERS, S., C. CHARPENTIER, M. FEUILLAT, and A. VOILLEY. 1994. Influence of yeast cell walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 29 - 33.
- LÜTHI, H. and U. VETSCH. 1959. Contributions to the knowledge of the malo - lactic fermentation in wines and ciders. II. The growth promoting effect of yeast extract on lactic acid bacteria causing malo - lactic fermentation in wines. *J. Appl. Bacteriol.* 22: 384 - 391.
- MACRIS, B. J. and P. MARKAKIS. 1974. Transport and toxicity of sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *J. Sci. Food Agric.* 25: 21 - 29.
- MAICAS, S., J. V. GIL, I. PARDO, and S. FERRER. 1999. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Res. Int.* 32: 491 - 496.
- MAKDESI, A. K. and L. R. BEUCHAT. 1996. Improved selective medium for enumeration of benzoate - resistant, heat - stressed *Zygosaccharomyces bailii*. *Food Microbiol.* 13: 281 - 290.
- MALFEITO - FERREIRA, M., A. ST. AUBYN, and V. LOUREIRO. 1989. Long - chain fatty acid composition as a tool for differentiating spoilage wine yeasts. *Mycotaxon*. 36: 35 - 42.
- MALFEITO - FERREIRA, M., M. TARECO, and V. LOUREIRO. 1997. Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 143 - 155.
- MALLETROIT, V., J. - X. GUINARD, R. E. KUNKEE, and M. J. LEWIS. 1991. Effect of pasteurization on microbiological and sensory quality of white grape juice and wine. *J. Food Proc. Preserv.* 15: 19 - 29.
- MAMEDE, M. E. O., H. M. A. B. CARDELLO, and G. M. PASTORE. 2005. Evaluation of an aroma similar to that of spar-

- kling wine: sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. *Food Chem.* 89: 63 – 68.
- MANCA DE NADRA, M. C. and A. M. STRASSER DE SAAD. 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 101 – 106.
- MANGINOT, C., J. L. ROUSTAN, and J. M. SABLAYROLLES. 1998. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enz. Microbial Technol.* 23: 511 – 517.
- MANSFIELD, A. K., B. W. ZOECKLEIN, and R. S. WHITON. 2002. Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 303 – 307.
- MARA, P. A. and L. F. BISSON. 2005. Bacterial causes of winery chloroanisole contamination. Abstr. 56th American Society for Enology Viticulture Annual Meeting, Seattle, WA. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 298A.
- MARET, R. and T. SOZZI. 1977. Flore malolactique de mouts et de vins du Canton du Valais (Suisse). I. *Lactobacillus* et *Pédiococcus*. *Ann. Tech. Agric.* 27: 255 – 273.
- MARET, R. and T. SOZZI. 1979. Flore malolactique de mouts et de vins du Canton du Valais (Suisse). II. Evolution des populations de lactobacilles et de pédiocoques au cours de la vinification d'un vin blanc (un Fendant) et d'un vin rouge (une Dole). *Ann. Tech. Agric.* 28: 31 – 40.
- MARGALIT, Y. 2004. *Concepts in Wine Technology*. The Wine Appreciation Guild, San Francisco, CA.
- MARGALITH, P. Z. 1981. *Flavour Microbiology*. Charles C. Thomas Publishers, Springfield, IL.
- MAROIS, J. J., A. M. BLEDSE, R. W. RICKER, and R. M. BOSTOCK. 1993. Sampling for *Botrytis cinerea* in harvested grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 261 – 265.
- MARTINEAU, B. and T. HENICK – KLING. 1995a. Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain EC1118 and malolactic fermentation with *Leuconostoc oenos* strain MCW. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 442 – 448.
- MARTINEAU, B. and T. HENICK – KLING. 1995b. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 526 – 536.
- MARTINEAU, B., T. ACREE, and T. HENICK – KLING. 1995. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Res. Int.* 28: 139 – 143.
- MARTINEZ – MURCIA, A. J., N. M. HARLAND, and M. D. COLLINS. 1993. Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from largesubunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small – and largesubunit rRNA derived trees. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 532 – 541.
- MARTINEZ – RODRIGUEZ, A. J., A. V. CARRASCO, and M. C. POLO. 2001. Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 155 – 160.
- MASLOW, J. N., A. M. SLUTSKY, and R. D. ARBEIT. 1993. Application of pulsed –

- field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (Eds.), pp. 563 - 572. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- MASON, A. B. and J. - P. DUFOUR. 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16: 1287 - 1298.
- MATEO, J. J., M. JIMENEZ, T. HUERTA, and A. PASTOR. 1992. Comparison of volatiles produced by four *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Monastrell musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 206 - 209.
- MAURICIO, J. C., S. GUJO, and J. M. ORTEGA. 1991. Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 301 - 308.
- MAURICIO, J. C., J. MORENO, L. ZEA, J. M. ORTEGA, and M. MEDINA. 1997. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Sci. Food Agric.* 75: 155 - 160.
- MAYER, A. M. and E. HAREL. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem.* 18: 193 - 215.
- MAYER, A. M. and R. C. STAPLES. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem.* 60: 551 - 565.
- MCDANIEL, M., L. A. HENDERSON, B. T. WATSON, and D. HEATHERBELL. 1987. Sensory panel training and screening for descriptive analysis of the aroma of Pinot noir wines fermented by several strains of malolactic bacteria. *J. Sensory Studies* 2: 149 - 167.
- MCDONALD, V. R. 1963. Direct microscopic technique to detect viable yeast cells in pasteurized orange drink. *J. Food Sci.* 28: 135 - 139.
- McEVILY, A. J., R. IYENGAR, and W. S. OTWELL. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 253 - 273.
- McMAHON, H., B. W. ZOECKLEIN, K. C. FUGELSANG, and Y. JASINSKI. 1999. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 23: 198 - 203.
- MEIDELL, J. 1987. Unsuitability of fluorescence microscopy for the rapid detection of small numbers of yeast cells on a membrane filter. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 159 - 160.
- MENDES FERREIRA, A., M. C. CLÍMACO, and A. MENDES FAIA. 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* 91: 67 - 71.
- MEYER, S. A., R. W. PAYNE, and D. YARROW. 1998. *Candida* Berkhout. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 64, pp. 454 - 573. Elsevier, New York, NY.
- MILLER, M. W. and H. J. PHAFF. 1998a. *Metschnikowia* Kamienski. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 39, pp. 256 - 267. Elsevier, New York, NY.
- MILLER, M. W. and H. J. PHAFF. 1998b. *Saccharomyces* E. C. Hansen. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 45, pp. 372 - 373. Elsevier, New York, NY.
- MILLET, V. and A. LONVAUD - FUNEL. 2000.

- The viable but non - culturable state of wine micro - organisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 136 - 141.
- MILLS, D. A., E. A. JOHANSEN, and L. COCOLIN. 2002. Yeast diversity and persistence in *Botrytis* - affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4884 - 4893.
- MILLS, J. M. 2001. *The Impact of Interactions between Lactobacillus and Saccharomyces spp. on Wine Fermentations*. Master of Science Thesis, Washington State University, Pullman, WA.
- MIRA DE ORDUÑA, R., S. - Q. LIU, M. L. PATCHETT, and G. J. PILONE. 2000. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 31 - 35.
- MIRA DE ORDUÑA R., M. L. PATCHETT, S. Q. LIU, and G. J. PILONE. 2001. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1657 - 1662.
- MISLIVEC, P. B., L. R. BEUCHAT, and M. A. COUSIN. 1992. Yeasts and molds. In: *Compendium of Microbiological Methods for the Examination of Foods*. C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser (Eds.), 3rd edition, Chapter 16, pp. 239 - 249. American Public Health Association, Washington, DC.
- MITRAKUL, C. M., T. HENICK - KLING, and C. M. EGLI. 1999. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiol.* 16: 3 - 14.
- MOELLER, T., K. AKERSTRAND, and T. MASOUD. 1997. Toxin - producing species of *Penicillium* and the development of mycotoxins in must and homemade wine. *Nat. Toxins* 5: 86 - 89.
- MONK, P. R. 1986. Rehydration and propagation of active dry wine yeast. *Aust. Wine Ind. J.* 1: 3 - 5.
- MONK, P. R. 1994. Nutrient requirements of wine yeast. In: *Proceedings of the New York Wine Industry Workshop*. T. Henick - Kling (Ed.), pp. 58 - 64. Geneva, NY.
- MONTEIRO, F. F. and L. F. BISSON. 1992. Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 1 - 10.
- MONTROCHER, R., M. C. VERNER, J. BRIOLEY, C. GAUTIER, and R. MARMEISSE. 1998. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 48: 295 - 303.
- MORA, J. and A. MULET. 1991. Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 133 - 136.
- MORA, J. and C. ROSSELLO. 1992. The growth and survival of *Pichia membranaefaciens* during fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 329 - 332.
- MORENO, J. J., C. MILLÁN, J. M. ORTEGA, and M. MEDINA. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Indust. Microbiol.* 7: 181 - 190.
- MORENO - ARRIBAS, V., S. TORLOIS, A. JOYEUX, A. BERTRAND, and A. LONVAUD - FUNEL. 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine - producing lactic acid bac-

- teria from wine. *J. Appl. Microbiol.* 88: 584 – 593.
- MORENO – ARRIBAS, M. V., M. C. POLO, F. JORGANES, and R. MUNOZ. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 117 – 123.
- MORNEAU, A. D. and R. MIRA DE ORDUÑA. 2005. Reduction of wine acetaldehyde levels by lactic acid bacteria. Abstr. 56th American Society for Enology Viticulture Annual Meeting, Seattle, WA. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 297A – 298A.
- MORRIS, E. O. and A. A. EDDY. 1957. Method for the measurement of wild yeast infection in pitching yeast. *J. Inst. Brew.* 63: 34 – 35.
- MOXON, E. R., P. B. RAINEY, M. A. NOWAK, and R. E. LENSKE. 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr. Biol.* 4: 24 – 33.
- MULLER, C. J., K. C. FUGELSANG, and V. L. WAHLSTROM. 1993. Capture and use of volatile flavor constituents emitted during wine fermentations. In: *Beer and Wine Production: Analysis, Characterization and Technological Advances*. B. H. Gump (Ed.), pp. 219 – 234. American Chemical Society, Washington, DC.
- MULLER, C. J., K. C. FUGELSANG, M. M. OSBORN, and B. H. GUMP. 1996. Effect of carbon monoxide on spoilage yeast. In: *Proceedings of the Wine Spoilage Microbiology Conference*, pp. 75 – 78. California State University, Fresno, CA.
- MULLIS, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56 – 61, 64 – 65.
- MUNOZ, E. and W. M. INGLEDEW. 1989a. Effect of yeast hulls on stuck and sluggish wine fermentations: importance of the lipid component. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1560 – 1564.
- MUNOZ, E. and W. M. INGLEDEW. 1989b. An additional explanation for the promotion of more rapid, complete fermentation by yeast hulls. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 61 – 64.
- MURRELL, W. G. and B. C. RANKINE. 1979. Isolation and identification of a sporing *Bacillus* from bottled brandy. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 247 – 249.
- MUSTERS, W., R. J. PLANTA, H. VAN HEERIKHUIZEN, and H. A. RAUÉ. 1990. Functional analysis of the transcribed spacers of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA: it takes a precursor to form a ribosome. In: *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*. W. E. Hill, A. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger, and J. R. Warner (Eds.), pp. 435 – 442. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- NADAL, D., B. COLOMER, and B. PINA. 1996. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1944 – 1950.
- NAULT, I., V. GERBAUX, J. P. LARPENT, and Y. VAYSSIER. 1995. Influence of pre-culture conditions on the ability of *Leuconostoc oenos* to conduct malolactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 357 – 362.
- NAVARRO, L., M. ZARAZAGA, J. SAENZ, F. RUIZ – LARREA, and C. TORRES. 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 88: 44 – 51.
- NEL, H. A., R. BAUER, G. M. WOL-

- FAARDT, and L. M. T. DICKS. 2002. Effect of bacteriocins Pediocin PD - 1, Plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 191 - 196.
- NES, I. F., D. B. DIEP, L. S. HAVARSTEIN, M. B. BRURBERG, V. EJSINK, and H. HOLO. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113 - 128.
- NG, W., M. MANKOTIA, P. PANTAZOPOULOS, R. J. NEIL, and P. M. SCOTT. 2004. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. *Food Add. Contam.* 21: 971 - 981.
- NIELSEN, J. C. and M. RICHELIEU. 1999. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 740 - 745.
- NIELSEN, J. C., C. PRAHL, and A. LONVAUD - FUNEL. 1996. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze - dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 42 - 48.
- NIEUWOUT, H. H., B. A. PRIOR, I. S. PRETORIUS, and F. F. BAUER. 2002. Glycerol in South African table wines: an assessment of its relationship to wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 23: 22 - 30.
- NIGAM, P. 2000. Wines. Specific aspects of oenology. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. R. K. Robinson, C. A. Batt, and P. D. Patel (Eds.), Volume 3, pp. 2316 - 2322. Academic Press, New York, NY.
- NISHINO, H., S. MIYAZAKI, and K. TOHJO. 1985. Effect of osmotic pressure on the growth rate and fermentation activity of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 170 - 174.
- NISSEN, P. and N. ARNEBORG. 2003. Characterization of early deaths of non - *Saccharomyces* yeasts in mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 180: 257 - 263.
- NOBLE, A. C. and G. F. BURSICK. 1984. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 110 - 112.
- NONOMURA, H. 1983. *Lactobacillus yamanashiensis* subsp. *yamanashiensis* and *Lactobacillus yamanashiensis* subsp. *mali* sp. and subsp. nov., nom. rev. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 33: 406 - 407.
- NYGAARD, M., H. GELFMAN, C. CATANIA, and C. PRAHL. 1998. Malolactic fermentation in Chardonnay: timing of inoculation, interactions with yeast and flavour development. Abstr. 49th American Society of Enology and Viticulture Annual Meeting, Sacramento, CA. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 457 - 458.
- NYGAARD, M., L. PETERSEN, E. PILATTE, and G. LAGARDE. 2002. Prophylactic use of lysozyme to control indigenous lactic acid bacteria during alcoholic fermentation. Abstr. 53rd American Society of Enology and Viticulture Annual Meeting, Portland, OR. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 240A.
- NYKÄNEN, L. 1986. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 84 - 96.
- NYKÄNEN, L. and I. NYKÄNEN. 1977. Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *J. Inst. Brew.* 83: 30 - 31.
- O'CONNOR - COX, E., F. M. MOCHABA, E. J. LODOLO, M. MAJARA, and B. AXCELL.

1997. Methylene blue staining: use at your own risk. *Tech. Quart. Master Brew. Assoc. Am.* 34: 306 - 312.
- OLIJVE, W. and J. J. KOK. 1979. Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Arch. Microbiol.* 121: 283 - 290.
- OLIVE, D. M. and P. BEAN. 1999. Principles and applications of methods for DNAbased typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1661 - 1669.
- OLIVER, J. D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43: 93 - 100.
- OLSEN, E. B. 1994. The use of ML starter cultures in the winery. In: *Proceedings of the New York Wine Industry Workshop*. T. Henick - Kling (Ed.), pp. 116 - 119. Geneva, NY.
- OSBORNE, J. P. 2005. *Inhibition of the malolactic fermentation by Saccharomyces cerevisiae during the alcoholic fermentation*. Ph. D. Dissertation. Washington State University, Pullman, WA.
- OSBORNE, J. P., R. MIRA DE ORDUÑA, G. J. PILONE, and S. - Q. LIU. 2000. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 191: 51 - 55.
- OUGH, C. S. 1964. Fermentation rates of grape juice. I. Effects of temperature and composition on white juice fermentation rates. *Am. J. Enol. Vitic.* 15: 167 - 177.
- OUGH, C. S. 1966. Fermentation rates of grape juice. II. Effect of initial °Brix, pH, and fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* 17: 20 - 26.
- OUGH, C. S. 1971. Measurement of histamine in California wines. *J. Agric. Food Chem.* 19: 241 - 244.
- OUGH, C. S. 1976. Ethyl carbamate in fermented beverages and food. I. Naturally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.* 24: 323 - 328.
- OUGH, C. S. 1993a. Dimethyl dicarbonate and diethyl dicarbonate. In: *Antimicrobials in Foods*. P. M. Davidson and A. L. Branen (Eds.), 2nd edition, Chapter 9, pp. 343 - 368. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- OUGH, C. S. 1993b. Sulfur dioxide and sulfites. In: *Antimicrobials in Foods*. P. M. Davidson and A. L. Branen (Eds.), 2nd edition, Chapter 5, pp. 137 - 190. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- OUGH, C. S. and J. L. INGRAHAM. 1960. Use of sorbic acid and sulfur dioxide in sweet table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 11: 117 - 122.
- OUGH, C. S. and M. A. AMERINE. 1966. Effects of temperature on wine making. California Agricultural Experiment Station Bulletin 827. University of California, Davis, CA.
- OUGH, C. S. and R. E. KUNKEE. 1974. The effect of fumaric acid on malo - lactic fermentation in wine from warm areas. *Am. J. Enol. Vitic.* 25: 188 - 190.
- OUGH, C. S. and M. L. GROAT. 1978. Particle nature, yeast strain, and temperature interactions on the fermentation rates of grape juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 881 - 885.
- OUGH, C. S. and A. A. BELL. 1980. Effects of nitrogen fertilization of grapevines on amino acids metabolism and higher - alcohol formation during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 122 - 123.
- OUGH, C. S. and E. A. CROWELL. 1987. Use of sulfur dioxide in winemaking. *J.*

- Food Sci.* 52: 386 – 388.
- OUGH, C. S. and G. TRIOLI. 1988. Urea removal from wine by an acid urease. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 303 – 307.
- OUGH, C. S. and M. A. AMERINE. 1988. *Methods for Analysis of Musts and Wines*, 2nd edition. John Wiley & Sons, New York, NY.
- OUGH, C. S., E. A. CROWELL, R. E. KUNKEE, M. R. VILAS, and S. LAGIER. 1987. A study of histamine production by various wine bacteria in model solutions and in wine. *J. Food Process. Preserv.* 12: 63 – 70.
- OUGH, C. S., R. E. KUNKEE, M. R. VILAS, E. BORDEU, and M. – C. HUANG. 1988a. The interactions of sulfur dioxide, pH, and dimethyl dicarbonate on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostoc oenos* MCW. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 279 – 282.
- OUGH, C. S., E. A. CROWELL, and B. R. GUTLOVE. 1988b. Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 239 – 242.
- OUGH, C. S., E. A. CROWELL, and L. A. MOONEY. 1988c. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 243 – 249.
- OUGH, C. S., M. DAVENPORT, and K. JOSEPH. 1989a. Effect of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 208 – 213.
- OUGH, C. S., D. STEVENS, and J. ALMY. 1989b. Preliminary comments on effects of grape vineyard nitrogen fertilization on the subsequent ethyl carbamate formation in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 219 – 220.
- OUGH, C. S., Z. HUANG, D. AN, and D. STEVENS. 1991. Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: effects of urea excretion and readsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 26 – 40.
- OURA, E. 1977. Reaction productions of yeast fermentations. *Process. Biochem.* 12: 19 – 21.
- PALLMAN, C. L., J. A. BROWN, T. L. OLINEKA, L. COCOLIN, D. A. MILLS, and L. F. BISSON. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 198 – 203.
- PAMPULHA, M. E. and V. LOUREIRO. 1989. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Lett.* 11: 269 – 274.
- PARDO, I., M. J. GARCÍA, M. ZÚÑIGA, and F. URUBURU. 1988. Evaluation of the API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 347 – 350.
- PARISH, M. E. and D. E. CARROLL. 1985. Indigenous yeasts associated with Muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 165 – 169.
- PARISH, M. E. and D. E. CARROLL. 1988. Effects of combined antimicrobial agents on fermentation initiation by *Saccharomyces cerevisiae* in a model broth system. *J. Food Sci.* 53: 240 – 242.
- PARISH, M. E. and P. M. DAVIDSON. 1993. Methods of evaluation. In: *Antimicro – bials in Foods*. P. M. Davidson and A. L.

- Branen (Eds.), 2nd edition, Chapter 17, pp. 597–615. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- PARK, S. K., R. B. BOULTON, and A. C. NOBLE. 2000. Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 91–97.
- PARKAR, S. G., S. H. FLINT, and J. D. BROOKS. 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *J. Appl. Microbiol.* 96: 110–116.
- PASTERIS, S. E. and A. M. STRASSER DE SAAD. 2005. Aerobic glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine. *Food Microbiol.* 22: 399–407.
- PATARATA, L., M. S. PIMENTEL, B. POT, K. KERSTERS, and A. M. FAIA. 1994. Identification of lactic acid bacteria isolated from Portuguese wines and musts by SDS–PAGE. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 288–293.
- PATYNOWSKI, R. J., V. JIRANEK, and A. J. MARKIDES. 2002. Yeast viability during fermentation and *sur lie* ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 8: 62–69.
- PAWSEY, R. H. 1974. *Techniques with Bacteria*. Hutchinson Publishers, London.
- PEDERSON, C. S., M. N. ALBURY, and M. D. CHRISTENSEN. 1961. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures. IV. Fungistatic effects of organic acids. *Appl. Microbiol.* 9: 162–167.
- PEDERSON, C. S., M. N. ALBURY, D. C. WILSON, and N. L. LAWRENCE. 1959. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures. I. Control of yeast growth in a commercial operation. *Appl. Microbiol.* 7: 1–6.
- PEINADO, R. A., J. A. MORENO, D. MUÑOZ, M. MEDINA, and J. MORENO. 2004. Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6389–6393.
- PEÑA – NEIRA, A., B. FERNÁNDEZ DE SIMÓN, M. C. GARCÍA – VALLEJO, T. HERNÁNDEZ, E. CADAHÍA, and J. A. SUAREZ. 2000. Presence of cork – taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *Eur. Food Res. Tech.* 211: 257–261.
- PEREZ, M. A., F. J. GALLEGO, I. MARTINEZ, and P. HIDALGO. 2001. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 461–466.
- PERI, C., M. RIVA, and P. DECIO. 1988. Crossflow membrane filtration of wines: comparison of performance of ultrafiltration, microfiltration, and intermediate cut – off membranes. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 162–168.
- PEYNAUD, E. 1984. *Knowing and Making Wine*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- PFAFF, H. J., M. N. MILLER, and E. M. MRAK. 1978. *The Life of Yeasts*, 2nd edition. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- PILATTE, E. and C. PRAHL. 1997. Biological deacidification of acid grape varieties by inoculation on must with a freeze – dried culture of *Lactobacillus plantarum*. Abstr. 48th American Society of Enology and Viticulture Annual Meeting, San Diego, CA. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 386.
- PILONE, D. A., G. J. PILONE, and B. C. RANKINE. 1973. Influence of yeast strain,

- pH, and temperature on degradation of fumaric acid in grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 24: 97 – 102.
- PILONE, G. J. 1986. Effect of triadimenol fungicide on yeast fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 304 – 305.
- PILONE, G. J. and C. PRAHL. 1990. The Viniflora concept – a new approach to malolactic fermentation. In: *Proceedings of the New Zealand Grape and Wine Symposium*. pp. 79 – 93. New Zealand Society for Viticulture and Oenology, Auckland, NZ.
- PILONE, G. J. and R. E. KUNKEE. 1965. Sensory characterization of wines fermented with several malo – lactic strains of bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 224 – 230.
- PILONE, G. J., R. E. KUNKEE, and A. D. WEBB. 1966. Chemical characterization of wines fermented with various malolactic bacteria. *Appl. Microbiol.* 14: 608 – 615.
- PILONE, G. J. and R. E. KUNKEE. 1972. Characterization and energetics of *Leuconostoc oenos* ML 34. *Am. J. Enol. Vitic.* 23: 61 – 70.
- PILONE, G. J., B. C. RANKINE, and D. A. PILONE. 1974. Inhibiting malo – lactic fermentation in Australian dry red wines by adding fumaric acid. *Am. J. Enol. Vitic.* 25: 99 – 107.
- PILONE, G. J., M. G. CLAYTON, and R. J. VAN DUIVENBODEN. 1991. Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose and ammonia from arginine. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 153 – 157.
- PIMENTEL, M. S., M. H. SILVA, I. CORTÊS, and A. M. FAIA. 1994. Growth and metabolism of sugar and acids of *Leuconostoc oenos* under different conditions of temperature and pH. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 42 – 48.
- PINA, C., C. SANTOS, J. A. COUTO, and T. HOGG. 2004. Ethanol tolerance of five non – *Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 21: 439 – 447.
- PITT, J. I. 2000. *Penicillium*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. R. K. Robinson, C. A. Batt, and P. D. Patel (Eds.), Volume 3, pp. 1647 – 1655. Academic Press, New York, NY.
- PLATA, C., C. MILLÁN, J. C. MAURICIO, and J. M. ORTEGA. 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* 20: 217 – 224.
- POMPILO, R. 1993. Malolactic fermentation... who's doing what – and why? *Vineyard Winery Manage.* 19 (Nov/Dec): 44 – 47.
- POOLMAN, B., D. MOLENAAR, E. J. SMID, T. UBBINK, T. ABEE, P. P. RENAULT, and W. N. KONINGS. 1991. Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173: 6030 – 6037.
- PORTER, L. J. and C. S. OUGH. 1982. The effects of ethanol, temperature, and dimethyl dicarbonate on viability of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet No. 522 in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 222 – 225.
- PRAHL, C. and J. C. NIELSEN. 1995. Development of *Leuconostoc oenos* malolactic cultures for direct inoculation. Presented at the Fifth International Symposium on Enology. Bordeaux, France (June 15 – 17).
- PRAPHAILONG, W., M. VAN GESTEL, G. H. FLEET, and G. M. HEARD. 1997. Evaluation of the Biolog system for identification of food and beverage yeasts. *Lett. Appl. Mi-*

- crobiol.* 24: 455 - 459.
- PRIPIS - NICOLAU, L., G. DE REVEL, A. BERTRAND, and A. LONVAUD - FUNEL. 2004. Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1176 - 1184.
- PUIG - DEU, M., E. LÓPEZ - TAMAMES, S. BUXADERAS, and M. C. TORRE - BORONAT. 1999. Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre - fermentation. *Food Chem.* 66: 35 - 42.
- PUPKO, T. and D. GRAUR. 1999. Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. *J. Mol. Evol.* 48: 313 - 316.
- QUESADA, M. P. and J. L. CENIS. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD - PCR) in the characterization of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 204 - 208.
- QUINSLAND, D. 1978. Identification of common sediments in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 70 - 71.
- RACCACH, M. 1987. Pediococci and biotechnology. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 14: 291 - 309.
- RADLER, F. 1990a. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 1 - 6.
- RADLER, F. 1990b. Possible use of nisin in winemaking. II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 7 - 11.
- RADLER, F. and B. GERWARTH. 1971. Über die bildung von flüchtigen gärungsnebenprodukten durch milchsäurebakterien. *Arch. Mikrobiol.* 76: 299 - 307.
- RADLER, F. and C. YANISSIS. 1972. Weinsäureabbau bei Milchsäurebakterien. *Arch. Microbiol.* 82: 219 - 239.
- RADLER, F., P. PFEIFFER, and M. DENNERT. 1985. Killer toxin in new isolates of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 269 - 272.
- RAMOS, M. T. and A. MADEIRA - LOPES. 1990. Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Lett.* 12: 229 - 234.
- RAMOS, A., J. S. Lolkema, W. N. KONINGS, and H. SANTOS. 1995. Enzyme basis for pH regulatin of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1303 - 1310.
- RANKINE, B. C. 1967. Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds. *J. Sci. Food Agric.* 18: 583 - 589.
- RANKINE, B. C. 1972. Influence of yeast strain and malo - lactic fermentation on composition and quality of table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 23: 152 - 158.
- RANKINE, B. C. and D. A. PILONE. 1973. *Saccharomyces bailii*, a resistant yeast causing serious spoilage of bottled table wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 24: 55 - 58.
- RANKINE, B. C., J. C. M. FORNACHON, and D. A. BRIDSON. 1969. Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis* 8: 129 - 134.
- RAPP, A. and H. MANDERY. 1986. Wine aroma. *Experientia* 42: 873 - 884.
- RASMUSSEN, J. E., E. SCHULTZ, R. E. SNYDER, R. S. JONES, and C. R. SMITH. 1995. Acetic acid as a causative agent in

- producing stuck fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 278 – 280.
- RAUHUT, D. 1993. Yeasts – production of sulfur compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 6, pp. 183 – 223. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- RAVJI, R. G., S. B. RODRIGUEZ, and R. J. THORNTON. 1988. Glycerol production by four common grape molds. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 77 – 82.
- RENEE TERRELL, F., J. R. MORRIS, M. G. JOHNSON, E. E. GBUR, and D. J. MAKUS. 1993. Yeast inhibition in grape juice containing sulfur dioxide, sorbic acid and dimethyldicarbonate. *J. Food Sci.* 58: 1132 – 1134.
- RIBÉREAU – GAYON, P. 1985. New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 1 – 10.
- RIBÉREAU – GAYON, P., D. DUBOURDIEU, B. DONÉCHE, and A. LONVAUD. 2000. *Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- RICHMOND, J. Y. and R. W. MCKINNEY. 1993. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 3rd edition. Public Health Service, U. S. Department of Health and Human Services, Washington, DC.
- RIESEN, R. 1992. Undesirable fermentation aromas. In: *Proceedings of the ASEV/ES Workshop: Wine Aroma Defects*. T. Henick – Kling (Ed.), pp. 1 – 43. American Society of Enology and Viticulture (Eastern Section), Corning, NY.
- RIVAS – GONZALO, J. C., J. F. SANTOS – HERNANDEZ, and A. MARINÉ – FONT. 1983. Study of the evolution of tyramine content during the vinification. *J. Food Sci.* 48: 417 – 418.
- RODRIGUES, N., G. GONCALVES, S. PEREIRA – DA – SILVA, M. MALFETTO – FERREIRA, and V. LOUREIRO. 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* 90: 588 – 599.
- RODRIGUEZ, A. V. and M. C. MANCA DE NADRA. 1995a. Effect of pH and hydrogen peroxide produced by *Lactobacillus hilgardii* on *Pediococcus pentosaceus* growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 59 – 62.
- RODRIGUEZ, A. V. and M. C. MANCA DE NADRE. 1995b. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus hilgardii* and its effect on *Leuconostoc oenos* growth. *Curr. Microbiol.* 30: 23 – 25.
- RODRÍGUEZ, M. E., C. A. LOPES, M. VAN BROOCK, S. VALLES, D. RAMÓN, and A. C. CABALLERO. 2004. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J. Appl. Microbiol.* 96: 84 – 95.
- RODRIGUEZ, S. B., E. AMBER, R. J. THORNTON, and M. R. McLELLAN. 1990. Malolactic fermentation in Chardonnay: growth and sensory effects of commercial strains of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 139 – 144.
- ROHN, S., H. M. RAWEL, and J. KROLL. 2002. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3566 – 3571.
- ROJAS, V., J. V. GIL, F. PIÑAGA, and P. MANZANARES. 2001. Studies on acetate ester production by non – *Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 283 – 289.
- ROJAS, V., J. V. GIL, F. PIÑAGA, and P. MANZANARES. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fer-

- mentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 181 – 188.
- ROMANO, P. and G. SUZZI. 1993. Sulphur dioxide and wine microorganisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 13, pp. 373 – 393. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- ROMANO, P., G. SUZZI, P. DOMIZIO, and F. FATICHENTI. 1997. Secondary products formation as a tool for discriminating non – *Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 239 – 242.
- ROSA, C. A. DA ROCHA, V. PALACIOS, M. COMBINA, M. E. FRAGA, A. DE OLIVEIRA REKSON, C. E. MAGNOLI, and A. M. DALCERO. 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Add. Contam.* 19: 408 – 414.
- ROSENQUIST, J. K. and J. C. MORRISON. 1989. Some factors affecting cuticle and wax accumulation on grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 241 – 244.
- ROZES, N., C. GARCIA – JARES, F. LARUE, and A. LONVAUD – FUNEL. 1992. Differentiation between fermenting and spoilage yeast in wine by total free fatty acid analysis. *J. Sci. Food Agric.* 59: 351 – 357.
- RUIZ, A., M. POBLET, A. MAS, and J. M. GUILLAMON. 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR – amplified 16S rDNA and 16S – 23S rDNA intergenic spacer. *Int. J. Syst. Microbiol.* 50: 1981 – 1987.
- SABATE, J., J. CANO, B. ESTEVE – ZARZOSO, and J. M. GUILLAMÓN. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157: 267 – 274.
- SABLAYROLLES, J. – M., C. DUBOIS, C. MANGINOT, J. – L. ROUSTAN, and P. BARRE. 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferm. Bioeng.* 82: 377 – 381.
- SAEKI, A., M. TANIGUCHI, K. MATSUSHITA, H. TOYAMA, G. THEERAGOOL, G. LOTONG, and O. ADACHI. 1997. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 317 – 323.
- SAGE, L., D. GARON, and F. SEIGLE – MURANDI. 2004. Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5764 – 5768.
- SALEMA, M., B. POOLMAN, J. S. Lolkema, M. C. DIAS, and W. N. KONINGS. 1994. Uniport of monoanionic L – malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *Eur. J. Biochem.* 225: 289 – 295.
- SALEMA, M., J. S. Lolkema, M. V. SAN RAMAO, and M. C. LOUREIRO – DIAS. 1996. The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L – malate fermentation. *J. Bacteriol.* 178: 3127 – 3132.
- SANCHO, T., G. GIMENEZ – JURADO, M. MALFEITO – FERREIRA, and V. LOUREIRO. 2000. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. *Food Microbiol.* 17: 613 – 624.
- SAUVAGEOT, F. and P. VIVIER. 1997. Effects of malolactic fermentation of sensory properties of four Burgundy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 187 – 192.
- SAUVAGEOT, N., K. GOUFFI, J. – M. LAPACE, and Y. AUFRAY. 2000. Glycerol me-

- tabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3 - hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 167 - 170.
- SCHMITT, M. J. and F. NEUHAUSEN. 1994. Killer toxin - secreting double - stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Virol.* 68: 1765 - 1772.
- SCHMITTHENNER, J. 1950. Die Wirkung der Kohlensäure aus Hefen und Bakererein. Bad Kreuznach: Seitz - Werke.
- SCHOEMAN, H., M. VIVIER, M. DU TOIT, L. M. T. DICKS, and I. S. PRETORIUS. 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647 - 656.
- SCHREIER, P. 1979. Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12: 59 - 111.
- SCHÜLTZ, H. and F. RADLER 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propandiol - 1, 3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Sys. Appl. Microbiol.* 5: 169 - 178.
- SCHÜTZ, M. and J. GAFNER. 1995. Lower fructose uptake capacity of genetically characterized strains of *Saccharomyces bayanus* compared to strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a likely cause of reduced alcoholic fermentation activity. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 175 - 180.
- SCOTT, P. M., T. FULEKI, and J. HARWIG. 1977. Patulin content of juice and wine produced from moldy grapes. *J. Agric. Food Chem.* 25: 434 - 437.
- SEA, K., C. BUTZKE, and R. BOULTON. 1998. Seasonal variation in the production of hydrogen sulfide during wine fermentations. In: *Chemistry of Wine Flavour*. A. L. Waterhouse and S. E. Ebeler (Eds.), pp. 81 - 95. American Chemical Society, Washington, DC.
- SEISKARI, P., Y. - Y. LINKO, and P. LINKO. 1985. Continuous production of gluconic acid by immobilized *Gluconobacter oxydans* cell bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 356 - 360.
- SEMON, M. J., C. G. EDWARDS, D. FORSYTH, and C. DINN. 2001. Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7: 52 - 59.
- SEÑORES, A. Z. and N. V. ALEGADO. 2005. Effective strategies in implementing HACCP in San Miguel breweries. *Tech. Quart. Master Brew. Assoc. Am.* 42: 16 - 20.
- SERRA, R., L. ABRUNHOSA, Z. KOZAKIEWICZ, and A. VENÂNCIO. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 63 - 68.
- SHARF, R. and P. MARGALITH. 1983. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Technol.* 17: 311 - 313.
- SHARPE, M. E., E. I. GARVIE, and R. H. TILBURY. 1972. Some slime - forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. *Appl. Microbiol.* 23: 389 - 397.
- SHIHATA, A. M. and E. M. MRÁK. 1951. The fate of yeast in the digestive tract of *Drosophila*. *Am. Natural.* 85 (825): 381 - 383.
- SHIMAZU, Y. and M. WATANABE. 1981. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. *J. Ferment. Technol.* 59: 27 - 32.
- SHIMIZU, K. 1993. Killer yeasts. In: *Wine*

- Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 8, pp. 243 – 264. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- SHINOHARA, T., S. KUBODERA, and F. YANAGIDA. 2000. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off – flavors in wine fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 90: 90 – 97.
- SIA, E. A., S. JINKS – ROBERTSON, and T. D. PETES. 1997. Genetic control of microsatellite instability. *Mutat. Res.* 383: 61 – 70.
- SIANTAR, D. P., C. A. HALVERSON, C. KIRMIZ, G. F. PETERSON, N. R. HILL, and S. M. DUGAR. 2003. Ochratoxin A in wine: survey by antibody – and polymeric – based SPE columns using HPLC/fluorescence detection. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 170 – 177.
- SIEIRO, C., J. CANSADO, D. AGRELO, J. B. VELÁZQUEZ, and T. G. VILLA. 1990. Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2936 – 2938.
- SILLA SANTOS, M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213 – 231.
- SILVA PEREIRA, C., J. J. FIGUEIREDO MARQUES, and M. V. SAN ROMÃO. 2000. Cork taint in wine: scientific knowledge and public perception – a critical review. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 26: 147 – 162.
- SILVA, P., H. CARDOSO, and H. GERÓS. 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 65 – 72.
- SILVA, S., F. RAMÓN – PORTUGAL, P. ANDRADE, S. ABREU, M. DE FATIMA TEXEIRA, and P. STREHALANO. 2003. Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 50 – 55.
- SILVER, J. and T. LEIGHTON. 1981. Control of malolactic fermentation in wine. 2. Isolation and characterization of a new malolactic organism. *Am. J. Enol. Vitic.* 32: 64 – 72.
- SIMPSON, R. F., J. M. AMON, and A. J. DAW. 1986. Off – flavour in wine caused by guaiacol. *Food Technol. Aust.* 38: 31 – 33.
- SIMPSON, R. F., D. L. CAPONE, and M. A. SEFTON. 2004. Isolation and identification of 2 – methoxy – 3, 5 – dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5425 – 5430.
- SLAUGHTER, J. C. and G. MCKERNAN. 1988. The influence of pantothenate concentration and inoculum size on the fermentation of a defined medium by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 94: 14 – 18.
- SLININGER, P. J., R. J. BOTHAST, and K. L. SMILEY. 1983. Production of 3 – hydroxypropionaldehyde from glycerol. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 62 – 67.
- SMITH, C. R. 2002. Volatile acidity reduction and other winegrape maturity enhancement applications of flavour – proof membranes. In: *Proceedings of the 13th International Enology Symposium*. H. Trogus, J. Gafner, and A. Sütterlin (Eds.), pp. 509 – 522, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Montpellier, France (June 9 – 12).
- SMITH, M. TH. 1998a. *Dekkera* van der Walt. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 27, pp. 174 – 177. Elsevier, New York, NY.
- SMITH, M. TH. 1998b. *Brettanomyces* Kuffer-

- ath and van Laer. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 63, pp. 450 - 453. Elsevier, New York, NY.
- SMITH, M. TH. 1998c. *Hanseniaspora* Zikes. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 34, pp. 214 - 220. Elsevier, New York, NY.
- SNOW, P. G. and J. F. GALLANDER. 1979. Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 45 - 48.
- SOBOLOV, M. and K. L. SMILEY. 1960. Metabolism of glycerol by an acrolein - forming *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* 79: 261 - 266.
- SOFOS, J. N. and F. F. BUSTA. 1993. Sorbic acid and sorbates. In: *Antimicrobials in Foods*. P. M. Davidson and A. L. Branen (Eds.), 2nd edition, Chapter 3, pp. 49 - 94. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- SOLES, R. M., C. S. OUGH, and R. E. KUNKEE. 1982. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 94 - 98.
- SOMERS, T. C. 1984. *Botrytis cinerea* - consequences for red wines. *Aust. Grape. Wine.* 244: 80 - 85.
- SOMMER, P., E. STOLPE, B. KRAMP, A. BUNTE, B. CAUCHY - ALVIN, E. PILATTE, J. AALLING, and J. HEINEMEYER. 2005. Flavor enhancement: mixed starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces thermotolerans*, and *Torulaspora delbrueckii*. Abstr. 56th American Society for Enology Viticulture Annual Meeting, Seattle, WA. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 309A.
- SOUFLEROS, E., M. - L. BARRIOS, and A. BERTRAND. 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 266 - 278.
- SPAYD, S. E. and J. ANDERSEN - BAGGE. 1996. Free amino acid composition of grape juice from 12 *Vitis vinifera* cultivars in Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 389 - 402.
- SPAYD, S. E., R. L. WAMPLE, R. G. EVANS, R. G. STEVENS, B. J. SEYMOUR, and C. W. NAGEL. 1994. Nitrogen fertilization of White Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 34 - 42.
- SPAYD, S. E., C. W. NAGEL, and C. G. EDWARDS. 1995. Yeast growth in Riesling juice as affected by vineyard nitrogen fertilization. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 49 - 55.
- SPIROPOULOS, A., J. TANAKA, I. FLERIANOS, and L. F. BISSON. 2000. Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 233 - 247.
- SPLITTSTOESSER, D. F. 1978. Fruits and fruit products. In: *Food and Beverage Mycology*. L. R. Beuchat (Ed.), pp. 83 - 109. AVI Publishing Co., Westport, CT.
- SPLITTSTOESSER, D. F. 1992. Direct microscopic count. In: *Compendium of Microbiological Methods for the Examination of Foods*. C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser (Eds.), 3rd edition, Chapter 5, pp. 97 - 104. American Public Health Association, Washington, DC.
- SPLITTSTOESSER, D. F. and B. O. STOYLA. 1987. Lactic acid spoilage in wine. *Wines Vines* 68: 65 - 66.
- SPLITTSTOESSER, D. F. and J. J. CHURNEY. 1992. The incidence of sorbic acid - resistant gluconobacters and yeasts on grapes grown in

- New York State. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 290 – 293.
- SPONHOLZ, W. R. 1991. Nitrogen compounds in grapes, must, and wine. In: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. J. Rantz (Ed.), pp. 196 – 199. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA.
- SPONHOLZ, W. R. 1993. Wine spoilage by microorganisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. H. Fleet (Ed.), Chapter 14, pp. 395 – 420. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- SPONHOLZ, W. R. and H. H. DITTRICH. 1985. Über die Herkunft von Gluconsäure, 2 – und 5 – oxo Gluconsäure sowie Glucuron – und Galacturonsäure in Mosten und Weinen. *Vitis* 24: 51 – 58.
- STANDER, M. A. and P. S. STEYN. 2002. Survey of ochratoxin A in South African wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 23: 9 – 13.
- STENDER, H., A. J. BROOMER, K. OLIVEIRA, H. PERRY – O' KEEFE, J. J. HYLDIG – NIELSEN, A. SAGE, and J. COULL. 2001a. Rapid detection, identification, and enumeration of *Escherichia coli* cells in municipal water by chemiluminescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 142 – 147.
- STENDER, H., C. KURTZMAN, J. J. HYLDIG – NIELSEN, D. SØRENSEN, A. BROOMER, K. OLIVEIRA, H. PERRY – O' KEEFE, A. SAGE, B. YOUNG, and J. COULL. 2001b. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 938 – 941.
- STENDER, H., A. SAGE, K. OLIVEIRA, A. J. BROOMER, B. YOUNG, and J. COULL. 2001c. Combination of ATP bioluminescence and PNA probes allows rapid total counts and identification of specific microorganisms in mixed populations. *J. Microbiol. Meth.* 46: 69 – 75.
- STEVENS, D. F. and C. S. OUGH. 1993. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 309 – 312.
- STINES, A. P., J. GRUBB, H. GOCKOWIAK, P. A. HENSCHKE, P. B. HØJ, and R. VAN HEESWIJK. 2000. Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 150 – 158.
- STRASSER DE SAAD, A. M. and M. C. MANCA DE NADRA. 1993. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 406 – 410.
- STRATFORD, M., P. MORGAN, and A. H. ROSE. 1987. Sulphur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces ludwigii*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2173 – 2179.
- STRATTON, J. E., R. W. HUTKINS, and S. L. TAYLOR. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Prot.* 54: 460 – 470.
- SUSLOW, T. V., M. N. SCHROTH, and M. ISAKA. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathol.* 72: 917 – 918.
- SUZUKI, K. 1993. Cell envelopes and classification. In: *Handbook of New Bacterial Systematics*. A. G. O'Donnell and M. Goodfellow (Eds.), pp. 195 – 250. Academic Press, London.
- SUZZI, G., P. ROMANO, and C. ZAMBONELLI. 1985. *Saccharomyces* strain selection in mini-

- mizing SO₂ requirement during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 199 – 202.
- SVEUM, W. H., L. J. MOBERG, R. A. RUDE, and J. F. FRANK. 1992. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: *Compendium of Microbiological Methods for the Examination of Foods*. C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser (Eds.), 3rd edition, Chapter 3, pp. 51 – 74. American Public Health Association, Washington, DC.
- SWANSON, K. M. J., F. F. BUSTA, E. H. PETERSON, and M. G. JOHNSON. 1992. Colony count methods. In: *Compendium of Microbiological Methods for the Examination of Foods*. C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser (Eds.), 3rd edition, Chapter 4, pp. 75 – 95. American Public Health Association, Washington, DC.
- SWINGS, J. 1992. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: *The Prokaryotes*. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. – H. Schleifer (Eds.), 2nd edition, Volume III, Chapter 111, pp. 2268 – 2286. Springer – Verlag, New York, NY.
- TAMACHKIAROW, A. and H. – C. FLEMMING. 2003. On – line monitoring of biofilm formation in a brewery water pipeline system with a fibre optical device. *Water Sci. Tech.* 47: 19 – 24.
- TAMAYO, C., J. UBEDA, and A. BRIONES. 1999. Relationship between H₂S – producing strains of wine yeast and different fermentation conditions. *Can. J. Microbiol.* 45: 343 – 346.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463 – 6471.
- TAYAMA, K., H. MINAKAMI, S. FUJIYAMA, H. MASSAI, and A. MISAKI. 1986. Structure of an acidic polysaccharide elaborated by *Acetobacter* sp. NDI – 1005. *Agric. Biol. Chem.* 50: 1271 – 1278.
- TEGMO – LARSSON, I. M., T. D. SPITTLER, and S. B. RODRIGUEZ. 1989. Effect of malolactic fermentation on ethyl carbamate formation in Chardonnay wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 106 – 108.
- TENOVER, F. C., R. D. ARBEIT, R. V. GÖERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. H. PERSING, and B. SWAMINATHAN. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed – field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233 – 2239.
- THELWELL, N., S. MILLINGTON, A. SOLINAS, J. BOOTH, and T. BROWN. 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28: 3752 – 3761.
- THOMAS, C. S., R. B. BOULTON, M. W. SILACCI, and W. D. GUBLER. 1993. The effect of elemental sulfur, yeast strain and fermentation medium on hydrogen sulfide production during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 211 – 216.
- THOMAS, D. S. 1993. Yeasts as spoilage organisms in beverages. In: *The Yeasts*. A. H. Rose and J. S. Harrison (Eds.), 2nd edition, Volume 5, pp. 517 – 561. Academic Press, New York, NY.
- THOMAS, D. S. and R. R. DAVENPORT. 1985. *Zygosaccharomyces bailii* – a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol.* 2: 157 – 169.
- THOMPSON, A. 2000. ATP bioluminescence. Application in beverage microbiology. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. R. K.

- Robinson, C. A. Batt, and P. D. Patel (Eds.), Volume 1, pp. 101 – 109. Academic Press, New York, NY.
- THORNTON, R. J. and S. B. RODRIGUEZ. 1996. Deacidification of red and white wines by a mutant of *Schizosaccharomyces malidevorans* under commercial winemaking conditions. *Food Microbiol.* 13: 475 – 482.
- TIMBERLAKE, C. F. and P. BRIDLE. 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27: 97 – 105.
- TONON, T. and A. LONVAUD – FUNEL. 2002. Arginine metabolism by wine lactobacilli isolated from wine. *Food Microbiol.* 19: 451 – 461.
- TORO, M. E. and F. VAZQUEZ. 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 347 – 354.
- TRACEY, R. P. and T. J. BRITZ. 1987. A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strains from wine. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 525 – 532.
- TRACEY, R. P. and T. J. BRITZ. 1989. Freon 11 extraction of volatile metabolites formed by certain lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1617 – 1623.
- TRAVERSO – RUEDA, S. and V. L. SINGLETON. 1973. Catecholase activity in grape juice and its implications in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 24: 103 – 109.
- TREDoux, H. G., J. L. F. KOCK, P. M. LATEGAN, and H. B. MULLER. 1987. A rapid identification technique to differentiate between *Saccharomyces cerevisiae* strains and other yeast species in the wine industry. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 161 – 164.
- UGARTE, P., E. AGOSIN, E. BORDEU, and J. I. VILLALOBOS. 2005. Reduction of 4 – ethylphenol and 4 – ethylguaiacol concentration in red wines using reverse osmosis and adsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 30 – 36.
- UGLIANO, M., A. GENOVESE, and L. MOIO. 2003. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5073 – 5078.
- UTHURRY, C. A., J. A. SUAREZ LEPE, J. LOMBARDERO, and J. R. GARCÍA DEL HIERRO. 2006. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chem.* 94: 262 – 270.
- VALERO, E., L. MOYANO, M. C. MILLAN, M. MEDINA, and J. M. ORTEGA. 2002. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chem.* 78: 57 – 61.
- VAN DER WALT, J. P. and A. E. VAN KERKEN. 1959. The wine yeasts of the Cape. Part II. The occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii* in South African table wines. *Antonie van Leeuwenhoek* 25: 145 – 151.
- VAN DER WALT, J. P. and A. E. VAN KERKEN. 1961. The wine yeasts of the Cape. Part V. Studies on the occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 27: 81 – 90.
- VAN KEULEN, H., D. G. LINDMARK, K. E. ZEMAN, and W. GERLOSKY. 2003. Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 149 – 154.
- VAN RENSBURG, P. and I. S. PRETORIUS. 2000. Enzymes in winemaking: harnessing natural

- catalysts for efficient biotransformations—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 52–73.
- VAN VUUREN, H. J. J. and C. J. JACOBS. 1992. Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 119–128.
- VAN VUUREN, H. J. J. and L. M. T. DICKS. 1993. *Leuconostoc oenos*: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 99–112.
- VARELA, F., F. CALDERÓN, M. C. GONZÁLES, B. COLOMO, and J. A. SUÁREZ. 1999. Effect of clarification on the fatty acid composition of grape must and the fermentation kinetics of white wines. *Eur. Food Res. Tech.* 209: 439–444.
- VAUGHAN – MARTINI, A. and A. MARTINI. 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Indust. Microbiol.* 14: 514–522.
- VAUGHAN – MARTINI, A. and A. MARTINI. 1998a. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 44, pp. 358–371. Elsevier, New York, NY.
- VAUGHAN – MARTINI, A. and A. MARTINI. 1998b. *Schizosaccharomyces* Lindner. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 48, pp. 391–394. Elsevier, New York, NY.
- VAUGHN, R. H. 1955. Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions. *Adv. Food Res.* 6: 67–108.
- VEIGA – DA – CUNHA, M., H. SANTOS, and E. VAN SCHAFTINGEN. 1993. Pathway and regulation of erythritol formation in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol.* 175: 3941–3948.
- VERSALOVIC, J., T. KOEUTH, and J. R. LUPSKI. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823–6832.
- VERSALOVIC, J., M. SCHNEIDER, F. J. DE BRUIJN, and J. R. LUPSKI. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence – based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell Biol.* 5: 25–40.
- VERSALOVIC, J., F. J. DE BRUIJN, and J. R. LUPSKI. 1998. Repetitive sequence – based PCR (rep – PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*. F. J. de Bruijn, J. R. Lupski, and G. M. Weinstock (Eds.), pp. 437–454. Chapman and Hall, New York, NY.
- VERSTREPEN, K. J., G. DERDELINCKX, J. – P. DUFOUR, J. WINDERICKX, J. M. THEVELEIN, I. S. PRETORIUS, and F. R. DELVAUX. 2003. Flavor – active esters: adding fruitiness to beer. *J. Biosci. Bioeng.* 96: 110–118.
- VIANNA, E. and S. E. EBELER. 2001. Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography – mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 49: 589–595.
- VIDAL – CAROU, M. C., R. CODONY – SALCEDO, and A. MARINÉ – FONT. 1991. Changes in the concentration of histamine and tyramine during wine spoilage at various temperatures. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 145–149.
- VILAS, M. 1993. Bottling line sampling and diagnostic techniques. *Vineyard Winery Manage.* 19 (Sept/Oct): 33–35.
- VILLETIZ, J. – C., D. STEINER, and H. TROGUS. 1984. The use of a beta glucanase as an enzyme in wine clarification and filtration. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 253–256.
- VOS, P. J. A. and R. S. GRAY. 1979. The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. *Am. J.*

- Enol. Vitic.* 30: 187 - 197.
- WAHLSTROM, V. L. and K. C. FUGELSANG. 1988. Utilization of yeast hulls in winemaking. *Calif. Agric. Tech. Inst. Bull.* 880103.
- WAINWRIGHT, T. 1970. Hydrogen sulphide production by yeast under conditions of methionine, pantothenate or vitamin B₆ deficiency. *J. Gen. Microbiol.* 61: 107 - 119.
- WALKER, G. M. 1998. *Yeast. Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- WALLING, E., M. DOLS - LAFARGUE, and A. LONVAUD - FUNEL. 2005. Glucose fermentation kinetics and exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* IOEB8801. *Food Microbiol.* 22: 71 - 78.
- WANG, L. F. 1985. *Off - flavor Development in White Wine by Brettanomyces and Dekkera*. Master of Science Thesis, California State University, Fresno, CA.
- WANG, X. D., J. C. BOHLSCHIED, and C. G. EDWARDS. 2003. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1 - 11.
- WARTH, A. D. 1977. Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 215 - 230.
- WARTH, A. D. 1985. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. *J. Food Prot.* 48: 564 - 569.
- WEBB, A. D. and J. L. INGRAHAM. 1960. Induced malo - lactic fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 11: 59 - 63.
- WEBSTER, D. R., C. G. EDWARDS, S. E. SPAYD, J. C. PETERSON, and B. J. SEYMOUR. 1993. Influence of vineyard nitrogen fertilization on the concentrations of monoterpenes, higher alcohols, and esters in aged Riesling wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 275 - 284.
- WEENK, G., W. OLIJVE, and W. HARDER. 1984. Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 400 - 405.
- WEISS, N. 1992. The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: *The Prokaryotes*. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. - H. Schleifer (Eds.), 2nd edition, Volume II, Chapter 68, pp. 1502 - 1507. Springer - Verlag, New York, NY.
- WEISS, N., V. SCHILLINGER, and O. KANDLER. 1983. *Lactobacillus trichodes* and *Lactobacillus heterohiochii*, subjective synonyms of *Lactobacillus fructivorans*. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 507 - 511.
- WHITTENBURY, R. 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 35: 13 - 26.
- WIBOWO, D., R. ESCHENBRUCH, C. R. DAVIS, G. H. FLEET, and T. H. LEE. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 302 - 313.
- WIBOWO, D., G. H. FLEET, T. H. LEE, and R. E. ESCHENBRUCH. 1988. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 64: 421 - 428.
- WIJSMAN, M. R., J. P. VAN DIJKEN, B. H. A. VAN KLEEFF, and W. A. SCHEFFERS.

1984. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie van Leeuwenhoek* 50: 183 – 192.
- WILKER, K. L. and M. R. DHARMADHIKARI. 1997. Treatment of barrel wood infected with acetic acid bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 516 – 520.
- WILLIAMS, J. T., C. S. OUGH, and H. W. BERG. 1978. White wine composition and quality as influenced by method of must clarification. *Am. J. Enol. Vitic.* 29: 92 – 96.
- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI, and S. V. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 – 6535.
- WILSON, B., C. R. STRAUSS, and P. J. WILLIAMS. 1986. The distribution of free and glycosidically – bound monoterpenes among skin, juice, and pulp fractions of some white grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 107 – 114.
- WIRTANEN, G. and S. SALO. 2003. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2: 293 – 306.
- WISSELINK, H. W., R. A. WEUSTHUIS, G. EGGINK, J. HUGENHOLTZ, and G. J. GROBBEN. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int. Dairy J.* 12: 151 – 161.
- WOOLFORD, M. K. 1975. Microbiological screening of the straight chain fatty acids ($C_1 - C_{12}$) as potential silage additives. *J. Sci. Food Agric.* 26: 219 – 228.
- YAJIMA, M. and K. YOKOTSUKA. 2001. Volatile compound formation in white wines fermented using immobilized and free yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 210 – 218.
- YAMADA, S., K. NABE, M. IZUO, and I. CHIBATA. 1979. Enzymic production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC 621. *J. Ferment. Technol.* 57: 221 – 226.
- YANAI, T. and N. SATO. 1999. Isolation and properties of β – glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 231 – 235.
- YANG, W. H. and E. C. PURCHASE. 1985. Adverse reactions to sulfites. *Can. Med. Assoc. J.* 133: 865 – 867, 880.
- YARROW, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: *The Yeasts*. C. P. Kurtzman and J. W. Fell (Eds.), 4th edition, Chapter 11, pp. 77 – 100. Elsevier, New York, NY.
- YOKOTSUKA, K., A. OTAKI, A. NAITOH, and H. TANAKA. 1993. Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of a high – acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 371 – 377.
- YOKOTSUKA, K., M. YAJIMA, and T. MATSU-DO. 1997. Production of bottle – fermented sparkling wine using yeast immobilized in double – layer gel beads or strands. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 471 – 481.
- YOKOTSUKA, K., T. TAKAYANAGI, T. OKUDA, and M. YAJIMA. 2003. Production of sweet table wine by termination of alcohol fermentation using an antimicrobial substance from paprika seed. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 112 – 118.
- YOUNG, E. T., J. S. SLOAN, and K. VAN

- RIPER. 2000. Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154: 1053 – 1068.
- YURDUGUL, S. and F. BOZOGLU. 2002. Studies on an inhibitor produced by lactic acid bacteria of wines on the control of malolactic fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* 215: 38 – 41.
- ZEE, J. A., R. E. SIMARD, L. L. HEUREUX, and J. TREMBLAY. 1983. Biogenic amines in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 6 – 9.
- ZEEMAN, W., J. P. SNYMAN, and C. J. VAN WYK. 1982. The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet substances and on quality of table wines. In: *Proceedings of the U. C. D. Grape and Wine Centennial*. A. D. Webb (Ed.), pp. 79 – 90. University of California, Davis, CA.
- ZIMMERLI, B. and J. SCHLATTER. 1991. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutat. Res.* 259: 325 – 350.
- ZOECKLEIN, B. W., K. C. FUGELSANG, B. H. GUMP, and F. S. NURY. 1995. *Wine Analysis and Production*. Chapman and Hall, New York, NY.



葡萄酒酿造微生物学 ——实验技术与规程 (第二版)

WINE MICROBIOLOGY

Practical Applications
and Procedures
(SECOND EDITION)

[美] Kenneth C. Fagelsang 著
Charles G. Edwards
徐 岩 康文怀 主译

 中国轻工业出版社




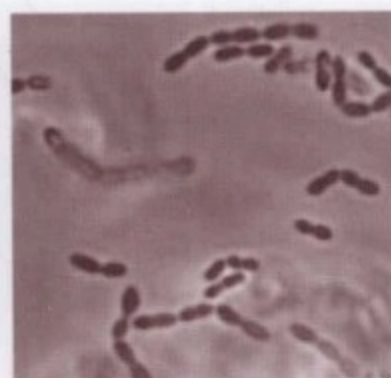
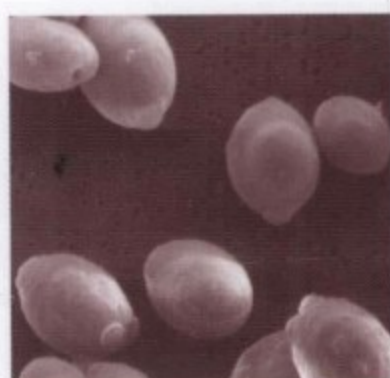
WINE MICROBIOLOGY

Practical Applications and Procedures

(SECOND EDITION)



 Springer



葡萄酒酿造 微生物学


——实验技术与规程

(第二版)

Kenneth C. Fugelsang
Charles G. Edwards

著

徐 岩 康文怀 主译

 中国轻工业出版社



WINE MICROBIOLOGY
Practical Applications and Procedures
(SECOND EDITION)

葡萄酒酿造微生物学
——实验技术与规程
(第二版)

上架建议：微生物

ISBN 978-7-5019-7477-1



9 787501 974771 >

定价：42.00元

序

近年来，我国葡萄酒产业发展迅猛。优良酿酒葡萄区域化种植逐步实施，葡萄品种多样化，葡萄酒产量持续增加，产品结构不断优化，葡萄酒质量逐渐提高。

在经济全球化的今天，中国既要了解世界，也要让世界认识中国。为进一步提高中国葡萄酒的内在品质，突出中国葡萄酒的特征性与差异性，就必须结合生产实际，对葡萄酒酿造的每一环节进行细化、深化、创新。其中，微生物与葡萄酒酿造联系最为直接、紧密，无论是葡萄的采收、发酵、贮存，还是葡萄酒的稳定及风味等均与微生物密切相关。因此，深入认识葡萄酒与微生物之间的关系具有重要的实践意义。

这次由徐岩教授等翻译的 Kenneth C. Fugelsang 和 Charles G. Edwards 教授所著的《Wine Microbiology》一书，内容丰富。该书既有理论又有实践，涉及葡萄酒酿造与微生物、质量关键点控制、实践操作规范等，特别是针对葡萄酒实际生产的问题进行了剖析，提出了新的见解；介绍了新科学技术在葡萄酒行业中的应用等。该书可供葡萄酒生产企业、科学研究单位、院校相关专业师生、葡萄酒爱好者等学习、借鉴和参考，定会受到广大读者的欢迎。

赵光鳌

2010年1月 于江南大学




译者序

随着我国葡萄酒产业的不断发展，葡萄酒酿造科学的交流也日益频繁。2008年4月笔者应邀在美国加利福尼亚州大学戴维斯分校考察合作时，阅读了 Kenneth C. Fugelsang 和 Charles G. Edwards 教授所著的 *Wine Microbiology* 一书，发现该书具有科学性强、学术价值高、实用性强等特点，适合推荐给国内同行。

纵览全书，它涵盖了葡萄酒企业及其学术研究机构中常见的微生物问题，同时也吸收了最新的学术成果。该书涉及葡萄与葡萄酒微生物，葡萄酒酿造与生产过程涉及的微生物，微生物实验室操作规范等三部分。介绍了葡萄园和葡萄酒酿造过程涉及的酵母菌、细菌、霉菌等，着重阐述了影响葡萄酒品质和微生物学稳定性的相关微生物，如酵母菌、乳酸菌、醋酸菌、曲霉等；介绍了葡萄园、酿酒厂、发酵前期、发酵期间、存贮期间微生物群体构成、变化、相关控制措施等，以及酒厂卫生、腐败等；介绍了实验室常规设备、培养基制备等，群体或某类微生物检测、鉴定技术，实验室配置、安全等。

目前我国有较多关于普通微生物学的书籍，但涉及葡萄与葡萄酒酿造微生物学的专业书籍甚少。《葡萄酒酿造微生物学》的翻译出版，不仅能介绍国外葡萄酒酿造微生物学研究现状，引进先进科学技术，而且能充实、丰富我国相关企业、院校、科研单位对葡萄酒酿造微生物的认识与研究，更好地促进我国葡萄酒产业的发展。

徐岩、康文怀承担了本书的主要翻译工作，参与翻译的还有吴群博士、王海燕、王玉霞、王珊珊、陈双、高亦豹、尹建邦、王睿等，特此表示感谢。



于蠡湖校区

第二版序言

组织《葡萄酒酿造微生物学》所需要的大量材料是一项很艰巨的工作。第二版《葡萄酒酿造微生物学》的内容可分成三部分：葡萄和葡萄酒酿造微生物学（第1~4章），葡萄酒酿造与生产过程（第5~11章），实验室操作规范及流程（第12~19章）。由于各讨论的主题常常存在相互交叉，因此我们努力使各相关信息保持相对完整，以减少查找信息所遇到的困难。

第一部分，葡萄与葡萄酒酿造的微生物。阐述了葡萄醪、葡萄汁和葡萄酒中发现的微生物，即酵母、乳酸菌、醋酸菌以及霉菌等。这部分重点介绍了这些微生物的分类学、代谢、营养需求，以及对葡萄酒品质的影响。

第二部分，葡萄酒酿造与生产过程。着重强调了该类微生物对酿酒师的实践意义。它包括对微生物管理一般性问题的讨论，以及对微生物生态学的深入探讨。该部分阐述了葡萄酒卫生学方面的一般原则（第9章），质量控制规范的执行（第10章），特定葡萄酒腐败微生物（第11章）。

第三部分，实验室操作规范及流程。它首先介绍了显微镜的使用（第12章），葡萄酒微生物鉴定和计数技术（第13~16章）。由于葡萄酒中发现的有机和无机沉淀常与微生物问题相混淆，所以第17章介绍了一些典型沉淀的鉴定方法及显微照片。第18~19章介绍了如何布置葡萄酒酿造微生物实验室及相关安全问题。该部分附有微生物学常用的词汇表。



致 谢

作者感谢参与该书编撰的几位个人与单位。首先，我们要感谢给予该项目支持的加州州立大学（加州弗雷斯诺）和华盛顿州立大学（华盛顿州普尔曼）。感谢给予技术支持的 W. D. Edinger（Canandaigua 葡萄酒公司，加州，马德拉）、R. Morenzoni（葡萄酒酿造技术服务中心，加州，莫德斯托）、B. Watson（Chemeketa 社区学院，俄勒冈州，塞勒姆），以及给予编辑帮助的 S. Safren 女士（施普林格科学商业媒体）。特别感谢提供 HACCP 材料和技术支持的 R. H. Dougherty 和 B. A. Rasco（华盛顿州立大学，华盛顿州普尔曼），也感谢 Eiji Akaboshi、Peter Gray、Cheryl Mitchell、Henry Moore Jr. 和 Roy Thornton 在提供和优化微生物显微照片方面给予的帮助。感谢以下单位或个人允许使用他们的图表版权，如《美国酿酒学与葡萄栽培学》杂志（*American Journal of Enology and Viticulture*），美国公共健康协会（American Public Health Association），《澳大利亚葡萄与葡萄酒研究》（*Australian Journal of Grape and Wine Research*），Blackwell 出版公司，Elsevier Ltd.，John Wiley & Sons Ltd. 和《细菌学》杂志（*Journal of Bacteriology*），Invitrogen 公司，R. Pawsey，施普林格科学商业媒体（Springer Science and Business Media），WineBugs LLC，《葡萄酒和葡萄》（*Wines and Vines*）。

作者同时要感谢世界各地的葡萄酒行业、商业以及大学同事等，没有他们不断提供的支持、建议和创意，本书的编撰是不可能完成的。

最后，特别感谢与我一起工作过的在校学生、毕业生、研究人员、技术人员及同事等。正是通过他们在技术研究和工艺开发上的不断努力，才加深了对葡萄酒酿造微生物学的理解，并得以顺利完成该书。



前 言

世界范围内的葡萄酒酿造协会一直存在着哲学意义上两种不同的观点：一方面，部分酿酒师和酒厂强调通过采纳新的研究成果及技术对葡萄酒酿造过程进行科学改进；另一方面，其他酿酒师和酒厂则愿意采用传统的“旧世界（Old World）”的酿造方法来突出葡萄酒酿造的艺术性。在撰写该书时，其目的并不是去争论二者之间的优缺点，而是提供一种参考工具，以供全球葡萄酒酿造者、研究者以及学生使用。

自 1997 年《葡萄酒酿造微生物学》第一版出版以来，又出现了许多新的信息及概念。也许，在过去十年中最引人注目的是现代分子技术的实时应用。基于基因水平上相类似的技术，一些技术已经不局限于以往深奥的实验室，而能利用快速鉴定微生物手段来解决一些生产实际问题。另外一种新技术应用是关于非酿酒酵母发酵剂的使用，它不仅能赋予葡萄酒一种新的风味，而且能改变其酒体特点。酿酒师也越来越关注腐败微生物的问题，这包括酒香酵母（*Brettanomyces*）、乳酸菌（*Lactobacillus*）、片球菌（*Pediococcus*）以及接合酵母（*Zygosaccharomyces*）等。其中一些微生物是来源于葡萄栽培方式的变化（如，延长挂果时间）。

尽管存在大量不断增加的有用信息，仍旧难以全面理解不同微生物对葡萄酒质量，以及微生物与葡萄酒加工技术之间复杂的相互作用关系。比较突出的例子是酒香酵母，它可能是葡萄酒行业中最神秘、最具有争议的一种微生物。尽管早期一些酿酒师把酒香酵母看作一种危害性微生物，但在新的世纪里则把它看作一种有益的微生物。我们期望，随着研究和试验的不断发展，将能够在葡萄酒酿造过程中为酿酒师提供更好的微生物控制方案，从而能不断提高葡萄酒质量。

我们真诚希望读者能从第二版《葡萄酒酿造微生物学》中发现有用信息，并能为葡萄酒厂、实验室、学生学习提供帮助。若你对作者有任何反馈意见（潜在的错误、对第三版的想法或其他），请随时写信或通过电子邮件联系我们。

再见！

Kenneth C. Fugelsang 和 Charles G. Edwards

2006 年 2 月 14 日

图书在版编目 (CIP) 数据

葡萄酒酿造微生物学: 实验技术与规程: 第2版/
(美) 福杰桑 (Kenneth, C. F.) 等著; 徐岩, 康文
怀译. —北京: 中国轻工业出版社, 2010. 6

ISBN 978-7-5019-7477-1

I. ①葡… II. ①福… ②徐… ③康… III. ①葡萄酒 -
微生物学 IV. ①TS262. 6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 006051 号

Translation from the English language edition: Wine Microbiology by Kenneth C. Fugelsang, Charles
G. Edwards, Copyright© 2007 Springer Science + Business Media, LLC. All Rights Reserved.

责任编辑: 江 娟

策划编辑: 江 娟

责任终审: 滕炎福

封面设计: 锋尚设计

版式设计: 王超男

责任校对: 吴大鹏

责任监印: 马金路

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 三河市世纪兴源印刷有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2010 年 6 月第 2 版第 1 次印刷

开 本: 720 × 1000 1/16 印张: 20. 25

字 数: 403 千字

书 号: ISBN 978-7-5019-7477-1 定价: 42. 00 元

著作权合同登记 图字: 01 - 2009 - 0401

邮购电话: 010-65241695 传真: 65128352

发行电话: 010-85119835 85119793 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

81103K1X101ZYW

